

Aus der Klinik und Poliklinik für Chirurgie  
Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Claus-Dieter Heidecke  
der Medizinischen Fakultät der Universität Greifswald

**Der Einfluss von chronischem Stress  
auf die Tumorangiogenese des Pankreaskarzinoms -  
Intravitalmikroskopische und andere Betrachtungen**

Inaugural – Dissertation  
zur  
Erlangung des akademischen  
Grades

Doktor der Medizin  
(Dr. med.)

der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Universität Greifswald

2019

vorgelegt von:  
Bruns, Lukas  
geb. am: 06.02.1984  
in: Braunschweig

Dekan:	Prof. Dr. med. Karlhans Endlich
1. Gutachter:	PD Dr. med. L. I. Partecke
2. Gutachter:	PD Dr. med. S. Hinz
Tag der Disputation:	17.01.2020

***Für meine Eltern und meine geliebte Familie***

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Pankreaskarzinom .....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Ätiopathogenese und Risikofaktoren .....	2
1.1.3 Klinik .....	4
1.1.4 Diagnostik .....	5
1.1.5 Histologie .....	7
1.1.6 Metastasierung .....	7
1.1.7 Klassifikation und Stadieneinteilung.....	8
1.1.8 Therapie.....	12
1.1.9 Prognose.....	14
1.2 Tumorpathologie des Pankreaskarzinoms .....	16
1.2.1 Pathophysiologie und Tumorstroma .....	16
1.2.2 Mechanismus der Metastasierung .....	16
1.3 Angiogenese .....	17
1.4 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor - VEGF .....	21
1.5 Mikrogefäßdichte - microvessel density (MVD) .....	22
1.6 Stress und Stresshormone .....	22
1.6.1 Stress.....	22
1.6.2 Stresshormone und die Wechselwirkung mit der Karzinogenese .....	23
1.6.3 Stress/Stresshormone beeinflussen das Pankreaskarzinom .....	25
1.7 Die Intravitalmikroskopie (IVM).....	27
1.7.1 Die Geschichte der Intravitalmikroskopie .....	27
1.7.2 Die Grundlagen der Intravitalmikroskopie .....	28
2 Zielsetzung der Arbeit.....	30

3	Material und Methoden.....	31
3.1	Materialien.....	31
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	31
3.1.2	Zellkulturmedium.....	31
3.1.3	Zelllinie.....	31
3.1.4	Kontrastmittel.....	31
3.1.5	Verbrauchsmaterialien.....	32
3.1.6	Instrumente/chirurgisches Besteck.....	33
3.1.7	Laborgeräte.....	33
3.1.8	Software.....	34
3.1.9	Kleintier-MRT.....	34
3.2	Methoden.....	35
3.2.1	Genehmigung.....	35
3.2.2	Tiere und Tierhaltung.....	35
3.2.3	Das Versuchsmodell.....	36
3.2.4	Zellbiologische Methode.....	37
3.2.5	Methode <i>in vivo</i> .....	38
3.2.6	Auswertung der Daten der Intravitalmikroskopie.....	53
3.3	Statistische Auswertung.....	54
3.4	Ausschluss von Versuchstieren.....	55
4	Ergebnisse.....	56
4.1	Von der Idee zur Durchführung - Die Etablierung einer neuen Methode.....	56
4.1.1	Der Intravitalmikroskopie-Untersuchungstisch.....	56
4.1.2	Der Aufbau zur Durchführung der Intravitalmikroskopie mit Versuchstier. .....	61
4.2	Vitalparameter: Herzfrequenz, Temperatur, mittlerer arterieller Blutdruck...	64
4.3	Mikrogefäßdichte - microvessel density (MVD).....	65
4.3.1	MVD nach 4 Wochen Stress.....	66

4.3.2	MVD nach 6 Wochen Stress .....	68
4.4	Tumorzvolumen.....	69
4.4.1	Tumorzvolumen nach 4 Wochen .....	69
4.4.2	Tumorzvolumen nach 6 Wochen .....	75
5	Diskussion .....	76
6	Zusammenfassung .....	94
7	Literaturverzeichnis .....	96
8	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen .....	108
9	Eidesstattliche Erklärung .....	110
10	Danksagung.....	111

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ 7nAChR	$\alpha$ 7-nikotinerger Acetylcholinrezeptor
$\beta$ -Ars	$\beta$ -Adrenorezeptoren
A.c.c.	Arteria carotis communis
Ang	Angiopoetin
APUD	Amine precursor uptake and decarboxylation
BCL	B-Cell lymphoma
bFGF	Basic fibroblast growth factor
CA4P	Combretastatin A-4 phosphate
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CRM	Circumferential Resection Margin
CT	Computertomographie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGF	Epidermal growth factor
EGF-R	Epidermal growth factor Rezeptor
ERCP	Endoskop. retrograde Cholangiopankreatikographie
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
EUS	Endoskopischer Ultraschall
EZM	Extrazellulärmatrix
FA	Flip angle
FAcP	Fibroblast activation protein
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FDG	$^{18}\text{F}$ -Fluordesoxyglukose
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein Isothiocyanat Conjugate
FosB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B
FoV	Field of View
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V.
IGF-1	Insulin like growth factor-1
IPMN	Intraduktal papillär muzinöse Neoplasie
IVM	Intravitalmikroskopie
LNR	Lymph Node Ratio
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MCN	Muzinös-zystische Neoplasie
MIPAV	Medical imaging processing and visualisation
MMP	Matrix-Metalloprotease
MRA	Magnetresonanz-Angiographie
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
MRT	Magnetresonanztomographie

MVD	Microvessel density oder Mikrogefäßdichte
MW	Arithmetische Mittelwert
NK	Natürliche Killerzellen
NNK	Nicotine-derived nitrosamine ketone/ 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphate Buffered Saline
p-CREB	cAMP response element-binding protein
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PDGF	Platelet-derived growth factors
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PKA	Proteinkinase A
PMA	Phorbol-12-myristat-13-Azetat
PRO	Propanolol
PSC	Pancreatic stellate cells
pTNM	Pathologische TNM-Klassifikation
Ras	Rat sarcoma
R-Klassifikation	Residualtumor-Klassifikation
ROI	Region of interest
RSDS	Repeat social defeat stress
SD	Standardabweichung
Src	Sarcoma
SPARC	Secreted protein acidic and rich in cysteine
SPN	Solide pseudopapilläre Neoplasien
TE	Echo time
TR	Repetition time
TNM	Tumor-Nodulus-Metastasen-Systems T - Primärtumor, N - Metastasen der Noduli lymphatici, M - Fernmetastasen
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF-R	Vascular endothelial growth factor Rezeptor
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten



## **1 Einleitung**

Mit dem Begriff des Tumors ist im weitesten Sinn eine Schwellung oder Raumforderung gemeint. Dieser Begriff erlaubt jedoch keinen Rückschluss auf die Herkunft, so dass mit dem Begriff Tumor auch ein Ödem, eine Zyste oder eine Entzündung gemeint sein kann. Im engeren medizinischen Sinn ist ein Tumor eine unkontrollierte Neubildung von Körpergewebe (Neoplasie), die durch eine Fehlregulation des Zellwachstums hervorgerufen wird.

Die Einteilung der Tumoren in der Medizin erfolgt anhand ihrer Wertigkeit, der sogenannten Dignität. Diese ist nach dem Wachstumsmuster und dessen Eigenschaften bezüglich eines invasiven oder nicht-invasiven Wachstums sowie der Fähigkeit zur Metastasierung in drei Klassen unterteilt. Die benignen (gutartigen) Tumoren wachsen langsam und verdrängen dabei das umliegende Gewebe ohne selbst infiltrierend zu wachsen. Die malignen (bösartigen) Tumoren wachsen destruierend und infiltrierend in das umliegende Gewebe ein. Des Weiteren erfolgt bei der malignen Variante eine Aussaat der Tumorzellen in andere Körperregionen über hämatogene und/oder lymphogene Metastasen oder ein lokales Wachstum per continuitatem. Die dritte Gruppe, die als semimaligne Tumoren bezeichnet wird, besitzt das Wachstumsverhalten der malignen Tumoren, ohne jedoch Metastasen zu bilden.

In Deutschland erkrankten 2014 laut einer gemeinsamen Publikation „Krebs in Deutschland“ der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. (GEKID) und des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut 249.200 Männer und 227.000 Frauen neu an einer Krebserkrankung. Die häufigsten Krebserkrankungen waren bei den Männern nach wie vor Prostatakrebs an erster Stelle (57.370 Neuerkrankungen im Jahr 2014), außerdem Lungenkrebs an zweiter Stelle (34.560) und Darmkrebs an dritter Stelle (33.120). Bei den Frauen war der häufigste Tumor an der Brustdrüse (69.220), gefolgt von Tumoren des Darms an zweiter (27.890) und Tumoren der Lunge an dritter Stelle (19.280) [1].

### **1.1 Das Pankreaskarzinom**

#### **1.1.1 Epidemiologie**

Am Pankreaskarzinom erkrankten 2014 in Deutschland laut GEKID 17.100 Menschen. Die Anzahl der Neuerkrankungen lag bei den Frauen mit 8.580

Neuerkrankungen minimal höher als bei den Männern mit 8.550 Neuerkrankungen. Bei den Frauen lag das Pankreaskarzinom mit 3,8 % an sechster Stelle und bei den Männern mit 3,4 % an zehnter Stelle der Gesamthäufigkeit der Neuerkrankungen. Das mittlere Erkrankungsalter lag bei den Männern um das 72. und bei den Frauen um das 75. Lebensjahr. Das Lebenszeitrisko beträgt ungefähr 1,7 %. Die jährliche Mortalität der Pankreaskarzinompatienten relativ zu allen Krebstodesfällen liegt bei den Männern im Durchschnitt bei 6,8 % und bei den Frauen bei 8,2 % und somit für beide Geschlechter an vierter Stelle der Krebstodesfälle. Seit Ende der 1990er Jahre sind die altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberaten bei den Männern konstant geblieben. Bei den Raten der Frauen zeichnete sich ein leichter Anstieg ab. Die absolute Zahl der Neuerkrankungen und Sterbefälle hat für beide Geschlechter über die Jahre zugenommen.

Die Erkrankung hat eine sehr schlechte Prognose, da die Inzidenz des Pankreaskarzinoms sehr nahe bei der jährlichen Mortalitätsrate liegt und ein Langzeitüberleben die Ausnahme ist. Die 5-Jahresüberlebensrate liegt in Deutschland bei 9 % (Männer) bzw. 10 % (Frauen). Das Pankreaskarzinom weist damit die niedrigste Überlebensrate unter allen Krebserkrankungen auf. Eine der Ursachen hierfür ist der fortgeschrittene Krankheitsprozess mit der späten klinischen Manifestation der Erkrankung. Hinzu kommt das schlechte Ansprechen auf jede Form nicht-chirurgischer Therapien. Daraus resultiert häufig die Aussichtslosigkeit eines kurativen Therapieansatzes. Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren fehlt es an adäquaten und erfolgreichen Behandlungsstrategien, die nicht nur den Zeitraum des krankheitsfreien Intervalls, sondern auch das langfristige Überleben verbessern könnten [1, 2].

### **1.1.2 Ätiopathogenese und Risikofaktoren**

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist bislang noch unbekannt. Die Ursachen für das Pankreaskarzinom sind multifaktoriell bedingt. Die Risikofaktoren sind z. B. ein niedriger sozioökonomischer Status mit begleitender ungesunder Lebensweise, Nikotinkonsum und auch Passivrauchen (20 bis 30 % der dukalen Pankreaskarzinome werden mit Nikotinkonsum assoziiert), übermäßiger Alkoholkonsum, geringe körperliche Aktivität, Adipositas (BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>) und ein Diabetes mellitus Typ 2 [3].

In der Literatur findet man immer wieder Hinweise darauf, dass eine ungesunde Ernährung ein möglicher Risikofaktor sein könnte. Es wurden zahlreiche Strategien entwickelt, um durch die Einhaltung bestimmter Prozesse das Risiko einer Krebsentstehung zu minimieren [4]. Auf der einen Seite finden sich in manchen Studien der letzten Jahre immer wieder Assoziationen zwischen einer ungesunden Ernährungsweise und dem Entstehen eines Pankreaskarzinoms [5, 6]. Auf der anderen Seite konnte in Kohortenstudien jedoch kein Zusammenhang zwischen ungesunder Ernährung und dem Pankreaskarzinom nachgewiesen werden [7, 8]. Eine direkte Assoziation besteht somit nicht. Da aus biologischer Sicht ein Zusammenhang jedoch vermutet werden kann [9], besteht laut S-3 Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom die Empfehlung einer ausgewogenen Ernährung zur Senkung des Risikos [10].

Auch Geschlecht, Alter und Ethnie erhöhen die Erkrankungswahrscheinlichkeit. Weltweit erkranken, ganz im Gegensatz zu den o. g. Zahlen aus Deutschland, Männer häufiger am Pankreaskarzinom als Frauen. Die Ursachen hierfür wurden noch nicht gefunden, wobei eine Verbindung mit den o. g. Risikofaktoren bestehen könnte. Als weitere potentielle Risikofaktoren werden in manchen Studien chronische Infektionen sowohl mit Hepatitis B und C als auch mit *Helicobacter pylori* benannt [3]. Als gesicherte Risikofaktoren gelten chronisch rezidivierende Pankreatitiden. Hier reicht das relative Risiko von 2,3 bis 18,5. Die kumulative Inzidenz liegt nach fünf Jahren bei 1,1 %, nach 10 Jahren bei 1,8 % und nach 20 Jahren bei 4 % [11-14].

Nicht nur die o. g. Risikofaktoren erhöhen die Erkrankungswahrscheinlichkeit. In bis zu 10 % der Fälle konnte auch eine genetische Disposition als ursächlich nachgewiesen werden. Als mögliche genetische Auslösefaktoren sind die Tumorprädispositionssyndrome wie z. B. das Li-Fraumeni Syndrom, das FAMMM-Syndrom - familial atypical multiple mole-melanom syndrome, die FAP - familiäre adenomatöse Polyposis, das Peutz-Jeghers Syndrom und das familiäre Mamma- und Ovarialkarzinom zu nennen. Auch die hereditären Pankreatitiden und die zystischen Neoplasien des Pankreas sind mögliche Auslösefaktoren [3]. So liegt das kumulative Risiko, ein Pankreaskarzinom bis zum 70. Lebensjahr zu entwickeln, in der Gruppe der Menschen mit hereditären Pankreatitiden zwischen 40 und 44 % [15, 16]. Ein familiäres Pankreaskarzinom liegt dann vor, wenn mindestens zwei oder mehr Verwandte ersten Grades mit histologisch gesichertem Pankreaskarzinom, welches nicht Ausdruck eines anderen hereditären Karzinomsyndroms ist, erkranken

[17]. Auf der Grundlage von mehreren Fallkontrollierten Studien wurde angenommen, dass bei ca. 10 % aller Pankreaskarzinome in Deutschland eine familiäre Häufung und genetische Prädisposition vorliegen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Prävalenz der echten hereditären (bestätigten) Pankreaskarzinome nur bei ca. 3,5 % (Bereich zwischen 1,1 bis 3,5 %) aller Pankreaskarzinome liegt [18].

Welche Rolle Umweltfaktoren oder beruflich bedingte Schadstoffbelastungen spielen, ist bislang nicht eindeutig geklärt. Es scheinen jedoch einige Berufs- und Arbeitsfelder mit einem geringfügig höheren Risiko bei der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms assoziiert zu sein [19, 20]. Auch der Kontakt mit einigen Chemikalien (wie z. B. Pestizide, Herbizide und Fungizide sowie Chrom und Chromverbindungen) ist als möglicher Risikofaktor zu werten [21, 22].

### **1.1.3 Klinik**

Das Erkennen des Pankreaskarzinoms verursacht meist ein großes diagnostisches Problem, da es auf der einen Seite in den frühen Stadien keine Symptome zeigt und somit klinisch nicht in Erscheinung tritt, und auf der anderen Seite die bereits vorhandenen Symptome eher unspezifisch und nicht eindeutig pathognomonisch sind. Es treten z. B. bei einer chronischen Pankreatitis die Symptome wie Appetitverlust, Übelkeit, Gewichtsverlust und unspezifische Oberbauchbeschwerden auf [23]. Differentialdiagnostisch sollte hier auch an ein Pankreaskarzinom gedacht werden, da in einer retrospektiv angelegten Analyse etwa 15 % der Patienten mit einem Pankreaskarzinom bereits Monate vor Erstmanifestation des Pankreaskarzinoms über unspezifische Symptome wie Kraftlosigkeit, Inappetenz, Sättigungsgefühl oder die plötzliche Abneigung gegen Wein, Kaffee oder Zigaretten klagten [24]. Auch eine Pankreatitis mit fehlenden Hinweisen auf Gallensteine oder einen Alkoholabusus kann ein erster Hinweis auf ein Pankreaskarzinom sein und sollte weiter abgeklärt werden [25].

In etwa 25 % der Fälle kann ein Ikterus bei einem Pankreaskopfkarzinom ein Frühsymptom sein. Auch ein intermittierendes Auftreten eines Ikterus bei einem Papillenkarzinom ist möglich. In fortgeschrittenen Stadien präsentieren sich 50 % der Patienten mit mindestens einem der drei folgenden Symptome: Ikterus (bei 90 % der Patienten), Bauchschmerzen und Gewichtsverlust. Hierbei ist der Ikterus typisch für eine Raumforderung des Pankreaskopfes mit Ausbildung eines Courvoisier` Zeichens. Dieses ist beschrieben als das Vorhandensein eines Ikterus in

Kombination mit einer prallelastischen schmerzlos tastbaren Gallenblase und könnte die mögliche Folge des tumorbedingten Verschlusses des Ductus choledochus sein [26].

Die Tumoren des Pankreaskorpus bzw. der -kauda gehen eher mit unspezifischen Symptomen wie z. B. Bauchschmerzen einher. Bis zu 10 % der Patienten präsentieren sich initial nur mit einer neu aufgetretenen gestörten Glukosetoleranz oder einem Diabetes mellitus. Hierbei ist zu beachten, dass nur ein mäßiger Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus Typ 2 und dem Pankreaskarzinom besteht. So wird bei isoliertem neu aufgetretenem Diabetes mellitus Typ 2 ohne Vorhandensein anderer Symptome von weiteren diagnostischen Maßnahmen in Hinblick auf ein Pankreaskarzinom abgeraten [27, 28].

#### **1.1.4 Diagnostik**

Zu Beginn jeder Diagnostik sollte eine ausführliche Anamnese mit besonderem Blick auf die o. g. Risikofaktoren, die aktuellen Symptome und die familiäre Vorbelastung erfolgen. In der anschließenden körperlichen Untersuchung kann während der Palpation des Abdomens das o. g. Courvoisier` Zeichen, das sehr spezifisch, aber nicht besonders sensitiv in Bezug für das Vorhandensein eines Pankreaskarzinoms ist, auffällig sein. Auch auf nicht erklärbare Thrombosen oder eine Thrombophlebitis migrans sollte geachtet werden. Laborchemisch zeigen sich erhöhte Cholestaseparameter (Gesamt- bzw. direktes Bilirubin, alkalische Phosphatase, Gamma-Glutamyltranspeptidase). Sie können den Verdacht erhärten, sind aber nicht spezifisch für das Pankreaskarzinom. Eine weitere laborchemische Untersuchung beinhaltet die Bestimmung des Tumormarkers Carbohydrat-Antigen 19-9 (CA 19-9) [29]. Dieser Marker ist nicht spezifisch für das Pankreaskarzinom und eignet sich dementsprechend nicht als Screening- oder Diagnoseparameter, kann aber zur Einschätzung der Prognose eingesetzt werden [30, 31]. Es wird jedoch kein diagnostisches Verfahren empfohlen, mit dem ein erhöhter CA 19-9 Wert abgeklärt werden sollte. Besteht der Nachweis einer Pankreasraumforderung, sollte der Tumormarker bestimmt werden, da er sich zur postoperativen Verlaufskontrolle und Beurteilung des Pankreaskarzinoms eignet. Im Vergleich zu den präoperativ erhobenen Werten sollte es postoperativ zu einem Abfall kommen. Auch um den Erfolg einer nicht chirurgischen therapeutischen Behandlung abschätzen zu können,

sollte dieser Marker bestimmt werden. Im Falle eines Rezidivs würde es zu einem erneuten Anstieg kommen [32, 33].

Zur endgültigen Diagnosesicherung sind apparative Methoden unerlässlich. Zu Beginn werden die ultraschallgestützten Verfahren, wie die transabdominelle Sonographie und die Endosonographie, eingesetzt. Die Vorteile dieser Verfahren sind die gute Verfügbarkeit, das gute Verhältnis zwischen Spezifität und Sensitivität und dass sie kostengünstig sind. Der Nachteil dieser Methoden ist die große Abhängigkeit der diagnostischen Sicherheit vom Untersucher und den Ultraschallbedingungen des zu untersuchenden Patienten. Als Alternative und/oder weiterführende Untersuchungen können einerseits die endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) mit der Möglichkeit eines Stentings zur Ableitung der Gallenwege oder der Feinnadelpunktion zur Gewinnung einer Probe, andererseits die sogenannte „One-stop-shop“ Magnetresonanztomographie (MRT), bestehend aus abdominaler MRT, Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) und Magnetresonanz-Angiographie (MRA) durchgeführt werden [34, 35]. Diese beiden Verfahren besitzen mit knapp 90 % eine hohe Sensitivität. Für das klinische Staging hat allerdings die nichtinvasive Spiral-Computertomographie (Spiral-CT) mit einer Sensitivität von 98 % die größte Bedeutung und ist das Verfahren der Wahl für die Beurteilung der lokalen Ausbreitung des Primärherdes und der eventuell bestehenden Fernmetastasen [36]. Besteht der hochgradige Verdacht auf das Vorliegen eines Pankreaskarzinoms oder ist das Spiral-CT negativ oder mit nicht eindeutigem Befund, kann eine durch endoskopischen Ultraschall (EUS) gestützte Feinnadelpunktion durchgeführt werden. Es muss jedoch beachtet werden, dass durch dieses Verfahren die Gefahr sogenannter Stichkanalmetastasen besteht. Somit sollte bei potentiell kurativen Karzinomen laut Leitlinie eine sofortige operative Resektion angestrebt werden [10]. In 10 % der Fälle sind die organischen Verhältnisse meist erst intraoperativ zu klären [30]. In den letzten Jahren wurden zur weiteren Diagnostik Spezialuntersuchungen, wie die <sup>18</sup>F-Fluordesoxyglukose(FDG) - Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-CT und die PET-MRT eingeführt. Diese Verfahren zeichnen erhöhte metabolische Aktivitäten wie z. B. bei Tumoren und ggf. Entzündungen auf und dienen auch als möglicher Progosefaktor [37, 38]. Besteht durch die Anamnese der Verdacht auf eine mögliche hereditäre Genese, kann eine molekulargenetische Diagnostik durchgeführt werden.

### 1.1.5 Histologie

Anhand ihrer Differenzierung können Pankreastumore unterteilt werden in duktale, azinäre und endokrine Tumoren. Im Pankreas sind die benignen Tumoren eher selten. Als überwiegend benigne werden die zystischen Tumoren angesehen. Die Einteilung erfolgt in serös zystische Neoplasien, muzinös zystische Neoplasien (MCN), solide pseudopapilläre Neoplasien (SPN) und die intraduktale papillär muzinöse Neoplasie (IPMN). Jede dieser Formen kann jedoch maligne entarten [39]. Es wird geschätzt, dass die Prävalenz von zystischen Pankreastumoren bei 20 bis 30 % liegt. Die Hälfte dieser zystischen Pankreastumoren bilden die intraduktal papillär muzinösen Neoplasien (IPMN). Bei einer hohen Prävalenz der IPMNs und einer geringen Inzidenz des Pankreaskarzinoms ist davon auszugehen, dass nur wenige dieser nicht-invasiven Vorläuferversionen in ein invasives Karzinom übergehen [40]. Die maligne Variante - das Pankreaskarzinom - ist in bis zu 95 % der Fälle ein duktales Adenokarzinom (Pancreatic Ductal Adenocarcinoma – PDAC) der epithelial ausgekleideten Ausführungsgänge des exokrinen Pankreas. Etwa 70 % der Pankreaskarzinome entstehen im Kopf, 20 % im Körper und fünf bis 10 % im Schwanz des Pankreas [41]. Dem PDAC werden Sonderformen zugeordnet. Dazu gehören das hepatoide und anaplastische Pankreaskarzinom. Ca. ein Prozent aller exokrinen Pankreaskarzinome sind Azinuszellkarzinome [39].

### 1.1.6 Metastasierung

Das Pankreaskarzinom metastasiert auf zwei Hauptwegen. Die hämatogene Metastasierung des Pankreaskarzinoms erfolgt typischerweise in Leber, Lunge und Peritoneum. Auch eine Metastasierung in die Knochen ist möglich. Die lymphogene Metastasierung erfolgt in die regionären Lymphknoten. In der Literatur findet sich eine Quelle, die sogar intrapankreatische Metastasen in zwei Fällen beschreibt [42]. Eine weitere Form der Metastasierung kann über bzw. entlang der Nervenbahnen erfolgen [17].

Während oder als Vorstufe des Metastasierungsprozesses erfolgt ein Verlust der Zell-Zell-Adhäsion. Dieses bedingt den Übertritt der Tumorzellen durch die Basalmembran (Invasion) und die Möglichkeit der Fortbewegung im peripankreatischen und perineuralen Gewebe (Migration). Somit können die Zellen in Lymph- oder Blutgefäße eindringen (Intravasation) und diese in den bevorzugten

Zielgeweben wieder verlassen (Extravasation). Die Bildung von Metastasen ist möglich [43, 44].

### **1.1.7 Klassifikation und Stadieneinteilung**

Wurde die ausführliche Diagnostik mit histopathologischer Sicherung abgeschlossen, erfolgt die Klassifikation und Stadieneinteilung des Pankreaskarzinoms anhand der Histologie (z. B.: mehr als 85 % Adenokarzinome, andere: neuroendokrine, anaplastische oder Azinuszellkarzinome), der Lokalisation (Bsp.: 70 % Pankreaskopf und Processus uncinatus, 20 % Korpus und 5-10 % Pankreasschwanz) und der Tumorausbreitung (frühzeitige Invasion des peripankreatischen Gewebes mit Infiltration der Gefäße).

#### **1.1.7.1 TNM-Klassifikation**

Die Klassifikation des Pankreaskarzinoms erfolgt anhand des Tumor-Nodus-Metastasen-Systems (TNM). Das System zur Klassifikation maligner Tumoren wurde von P. Denoix (Frankreich) in den Jahren 1943 bis 1952 entwickelt und über die Jahre hinweg modifiziert. Die unten genannte Klassifikation in Tabelle 1 gilt für Karzinome des exokrinen Pankreas und für neuroendokrine Tumoren einschließlich der Karzinoide.



**Tabelle 1: Klassifikation und Stadieneinteilung nach dem TNM-System**

<b>T - Primärtumor</b>	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ*
T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung T1a Tumor 0,5 cm oder weniger in größter Ausdehnung** T1b Tumor >0,5 cm aber <1 cm in größter Ausdehnung** T1c Tumor >1 cm aber <2 cm in größter Ausdehnung**
T2	Tumor mehr als 2 cm aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung**
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung**
T4	Tumor infiltriert Truncus coeliacus, A. mesenterica superior und/oder A. hepatica communis

\* Tis schließt auch Läsionen nach der „PanIn-III“ Klassifikation ein

\*\* Schließt Invasion des peripankreatischen Weichgewebes mit ein

<b>N - Regionäre Lymphknoten</b>	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1 bis 3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknotenmetastasen

<b>M - Fernmetastasen</b>	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

(aus [45])

### 1.1.7.2 pTNM-Klassifikation: Die pathologische Klassifikation

Das Präfix „p“ steht für das pathologische Stadium - durch den Pathologen gesichert. Die pT- und pN-Kategorien entsprechen den T- und N-Kategorien. Für pM gilt: bei pM1 sind die Fernmetastasen mikroskopisch bestätigt. Diese Kategorie kann in gleicher Weise wie M1 weiter spezifiziert werden. pM0 und pMX sind keine anwendbaren Kategorien [45].

Die pTNM-Klassifikation sieht vor, dass mindestens zehn regionäre Lymphknoten untersucht werden sollten, um ein „pN0“ zu klassifizieren. Diese Zahl ist nicht durch Literaturdaten bestätigt. In der Literatur wird aufgeführt, dass die Rate an korrekten Klassifikationen mit der Anzahl der untersuchten Lymphknoten steigt [46].

### 1.1.7.3 UICC-Stadieneinteilung

Die Einteilung der Tumorstadien der Union internationale contre le cancer (UICC) ist der wichtigste Prognoseparameter nach Resektion eines Pankreaskarzinoms in kurativer Intention. Die Tabelle 2 zeigt die Stadieneinteilung nach UICC.

**Tabelle 2: UICC-Stadieneinteilung**

<b>Stadium 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Stadium IA</b>	T1	N0	M0
<b>Stadium IB</b>	T2	N0	M0
<b>Stadium IIA</b>	T3	N0	M0
<b>Stadium IIB</b>	T1, T2, T3	N1	M0
<b>Stadium III</b>	T1, T2, T3	N2	M0
	T4	Jedes N	M0
<b>Stadium IV</b>	Jedes T	Jedes N	M1

(aus [45])

### 1.1.7.4 Histopathologisches Grading

Das Grading (sog. Tumordifferenzierungsgrad) des duktaalen Adenokarzinoms des Pankreas wurde in der WHO-Klassifikation 2010 festgelegt und beruht auf histologischen und zytologischen Kriterien [47]. Neben der Drüsendifferenzierung gehen Anzahl der Mitosen sowie Kernatypien und Muzinproduktion in das Grading ein. Die Tabelle 3 zeigt die Einteilung des histopathologischen Gratings. Wird es konsequent angewendet, korreliert der histologische Differenzierungsgrad mit der Prognose [48].

**Tabelle 3: Histopathologischer Differenzierungsgrad**

GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

(aus: [45])

### 1.1.7.5 Residualtumor- (R-) Klassifikation

Das Fehlen oder Vorhandensein von einem Residualtumor (sog. Resttumor) nach Behandlung wird durch die Residualtumor- (R-) Klassifikation beschrieben. Tabelle 4 zeigt die unterschiedlichen Stadien. Die TNM- und pTNM-Klassifikationen beschreiben die anatomische Ausbreitung des Tumors (ausgenommen beim

Retinoblastom), jedoch ohne Berücksichtigung der Behandlung. Hier kann eine Ergänzung durch die R-Klassifikation, die den Tumorstatus nach Behandlung erfasst, erfolgen. Die R-Klassifikation ermöglicht Aussagen über den Effekt der Therapie und beeinflusst das weitere therapeutische Vorgehen. Des Weiteren können anhand der R-Klassifikation zuverlässige Voraussagen bezüglich der Prognose gestellt werden.

Die R-Klassifikation ist aus historischen Gründen nicht obligater Bestandteil der TNM-Klassifikation. Aufgrund ihrer prognostischen Bedeutung ist sie aber nach Behandlung, insbesondere nach chirurgischer Therapie, unerlässlich und daher als essentieller Bestandteil der Tumorklassifikation, neben der Erfassung der anatomischen Tumorausbreitung durch die TNM-Klassifikation, zwingend vorgesehen [45].

**Tabelle 4: Die unterschiedlichen Stadien der R-Klassifikation**

RX	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

(aus: [45])

Da es beim dukalen Adenokarzinom des Pankreas tumorbiologische und daraus resultierende morphologische Besonderheiten (wie z. B. die diskontinuierliche Ausbreitung, die desmoplastische Stromareaktion und die ausgedehnten Perineuralscheiden- bzw. Lymphgefäßinvasionen) gibt, kann die genaue Beurteilung des Resektionsrandes deutlich erschwert sein, da die Karzinomzellen häufig an diesen zirkumferentiellen Resektionsrand heranreichen. Somit konnten in der Vergangenheit fälschlicherweise R0-Situationen angenommen worden sein, obwohl eigentlich eine R1-Situation bestand [49]. In zahlreichen Studien wird über das Ausmaß des Resektionsrandes, die Einteilung in eine R0- oder R1-Situation und die damit einhergehende Prognose diskutiert [50-52]. Eine Erweiterung der R-Klassifikation durch das sogenannte „Konzept des zirkumferentiellen Resektionsrandes“ (engl.: Circumferential Resection Margin - CRM-Konzept) sollte stattfinden. Hierbei wird der Abstand des Tumors zum Resektionsrand angegeben. Dieses Konzept wird bereits beim Rektumkarzinom angewendet. Durch die Einführung des CRM-Konzeptes mit Angabe des minimalen Abstandes der

Karzinomzellen zum zirkumferentiellen Resektionsrand können Daten erhoben werden, die eine abschließende Bewertung in Hinblick auf das Risiko eines Rezidivs und der Prognose der operativen Behandlungsverfahren von Pankreaskarzinomen ermöglichen [45, 53, 54].

### 1.1.8 Therapie

Die Therapie des Pankreaskarzinoms erfolgt entweder in kurativer oder in palliativer Absicht. Es bestehen die Möglichkeiten eines chirurgischen und/oder medikamentösen Therapieansatzes in kurativer oder palliativer Absicht.

Die einzige kurative Therapieoption des Pankreaskarzinoms ist die chirurgische Resektion. Eine randomisierte Studie zeigte, dass bei einem lokal invasiven und als resektabel eingestuften Pankreaskarzinom ausschließlich die chirurgische Therapie die einzige kurative Maßnahme ist. Die Durchführung einer alleinigen Chemo- und/oder Radiotherapie führte nicht zur Heilung [55].

Da die Diagnose des Pankreaskarzinoms meist schon im fortgeschrittenen Stadium gestellt wird, sind die kurativen Möglichkeiten zu diesem Zeitpunkt sehr begrenzt. So besteht nur bei 10 bis 20 % der Patienten bei Erstdiagnose die Möglichkeit eines potentiell kurativen Therapieansatzes mittels einer chirurgischen Resektion [56, 57]. Eine chirurgische Resektion erfolgt bei als resektabel eingestuften Tumoren. Das Ziel der Resektion beim Pankreaskarzinom ist, laut Leitlinie, unabhängig von seiner Lokalisation die Resektion im Gesunden. So können auch bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen diese ggf. *en bloc* mit den Nachbarorganen reseziert werden [10].

Die kurative Therapie hat die vollständige operative makroskopische und mikroskopische (histologische) Entfernung des Tumorgewebes im Gesunden (sogenannte R0-Resektion) als Ziel. Dieses soll durch die Pankreatoduodenektomie als Mittel der operativen Therapie erreicht werden. Es wird hierbei die klassische (nach Kausch-Whipple) von der pyloruserhaltenden (nach Traverso-Longmire) Operation unterschieden [58]. Die Voraussetzung für diese beiden Formen der Operation ist die Lage des Pankreaskarzinoms im Pankreaskopf. So werden bei der klassischen Whipple-Operation neben dem befallenen Pankreaskopf auch der distale Magen, das Duodenum, das proximale Jejunum, die Gallenblase, der Ductus choledochus und regionäre Lymphknoten *en-bloc* reseziert. Im Vergleich hierzu wird bei der pyloruserhaltenden Variante auf die Resektion des distalen Magens einschließlich des Pylorus verzichtet. Eine Zusammenstellung von Meta-Analysen

zeigt, dass es zwischen den beiden Verfahren in Hinblick auf die postoperative Mortalität und Morbidität sowie auf das Überleben scheinbar keine signifikanten Unterschiede gibt. Jedoch soll es bei der Operation nach Traverso-Longmire zu signifikant geringeren Operationszeiten und Blutverlusten kommen [59, 60], so dass diese Methode aktuell bevorzugt wird [58]. Überschreiten die Tumoren eine bestimmte Größe oder liegt ein multifokaler Befall vor, kann eine totale Pankreatektomie erfolgen [61]. Eine Anpassung des operativen Verfahrens mit einer erweiterten Resektion und Rekonstruktion der Gefäße erfolgt bei entsprechender Infiltration venöser Gefäße, wie z. B. der Vena portae, Vena mesenterica oder Vena splenica [62]. Abhängig von der Lage des Pankreaskarzinoms wird bei den deutlich seltener auftretenden Tumoren des Pankreaskörpers bzw. des Pankreasschwanzes eine (subtotale) Pankreasteil- bzw. Pankreaslinksresektion oder gar eine totale Duodenopankreatektomie durchgeführt [63, 64]. Werden Fernmetastasen in der Leber oder der Lunge sowie eine ausgedehnte Lymphknotenmetastasierung (wenn diese als ausgedehnte Fernmetastasen gelten) oder eine Peritonealkarzinose nachgewiesen, schließt dieses eine kurative operative Behandlung aus [10].

Im Rahmen von aktuellen Studien werden neoadjuvante Therapieansätze mit Chemo-, Radio- oder kombinierter Radio-Chemotherapie als Möglichkeit zur Verbesserung der Resektabilität getestet. Es besteht bezüglich der Resultate jedoch keine eindeutige Datenlage [65]. Allerdings zeigen Metaanalysen, dass bei primär nicht resezierbaren Pankreaskarzinomen durch das oben beschriebene neoadjuvante Konzept die operative Resektabilität erreicht werden kann [66, 67].

Als eine weitere Therapieoption wird die Durchführung einer adjuvanten 6-monatigen Chemotherapie mit 5-Fluoruracil (5-FU) oder mit Gemcitabin bei sowohl R0- als auch R1-resezierten Patienten empfohlen. Dadurch zeigte sich ein verlängertes Überleben [68-70]. Entsprechende Änderungen wurden bereits in die AWMF S-3-Leitlinie des exokrinen Pankreaskarzinoms übernommen. Eine adjuvante Radiochemotherapie nach R0-Resektion, sowie eine additive Radiochemotherapie nach R1-Resektion und neoadjuvante Radio- und/oder Radiochemotherapien werden laut AWMF S-3-Leitlinie aus dem Jahr 2013 außerhalb von Studien nicht empfohlen und durchgeführt [10].

Befindet sich das Pankreaskarzinom bereits im fortgeschrittenen Tumorstadium oder bestehen bereits mehrere Metastasen, ist eine Resektion nicht mehr möglich. Eine Cochrane-Analyse bestätigte die Überlegenheit bezüglich Überlebenszeit und

Lebensqualität der palliativen Chemotherapie gegenüber einer rein supportiven Therapie [71]. Seit der von Burris et al. im Jahre 1997 veröffentlichten Studie hat sich Gemcitabin als Standard etabliert [72].

Bezüglich der Bedeutung einer Kombination aus Chemotherapie und molekularer Therapiestrategien (sog. „targeted therapies“) wurden in den letzten Jahre viele Phase-III-Studien durchgeführt. Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2017 wertete neun Studien mit über 4500 Patienten aus. Es konnte gezeigt werden, dass es beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom keine signifikante Verbesserung des Überlebens bei einer Therapie mit Gemcitabin plus einer "targeted therapy" im Vergleich zu einer Gemcitabinmonotherapie gab [73].

### **1.1.9 Prognose**

Das Pankreaskarzinom gehört trotz intensiver Forschung weltweit immer noch zu den Tumoren mit der schlechtesten Prognose. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt bei allen Patienten mit einem Pankreaskarzinom ca. sechs Prozent. Damit liegt das Pankreaskarzinom in den USA und Europa an vierter Stelle der Krebstodesfälle [74]. Trotz vielfältiger chirurgischer Möglichkeiten ist die Voraussetzung einer potenziell kurativen Therapie jedoch lediglich bei ca. 20 % der Patienten gegeben. Die 5-Jahres-Überlebensrate nach R0-Resektion beträgt allerdings bis zu 25 %. Wenn die chirurgische Intervention in Pankreaszentren erfolgt, besteht eine niedrige Morbidität und eine Letalität von unter fünf Prozent. Eine anschließende Monochemotherapie (mit z. B. Gemcitabin oder 5-Fluoruracil) kann das mittlere Überleben auf bis zu 28 Monate erhöhen. Bei primär lokal irresektablen Pankreastumoren können in ca. 20 % der Fälle nach einer neoadjuvanten Radiochemotherapie diese reseziert werden. Dieses Vorgehen sollte jedoch nur im Rahmen von Studien erfolgen. Ausgedehnte Tumoren mit Infiltrationen der Nachbarorgane oder der Venen sollten im Rahmen von Multiviszeralresektionen entfernt werden. Im Gegensatz hierzu ist die Infiltration der zentralen Arterien ein Zeichen der Inoperabilität. Die angestrebte R0-Resektion kann aufgrund des perineuralen Wachstums in der Regel nicht erzielt werden. Da eine R2-Resektion aufgrund ihrer schlechten Langzeitprognose und hohen Morbidität vermieden werden sollte, werden bei fortgeschrittenen Tumoren heute die zentralen Arterien mit Hilfe eines speziellen Manövers („Artery first“) primär dargestellt. Bei fehlender Tumordinfiltration kann die Resektion fortgeführt werden. Die Lymphadenektomie ist

heute standardisiert und umfasst die Entfernung der regionalen und zentralen Lymphknoten, wobei eine routinemäßige Erweiterung der Lymphadenektomie keine Vorteile bietet [75-77]. Hieran zeigt sich, dass nicht nur der postoperative Resektionsstatus und das initiale Staging, sondern auch der Lymphknotenstatus wichtige Prognoseparameter sind [78]. Die Literatur bestätigt die Aussage, dass die Rate an korrekten Klassifikationen des pN - und damit die bessere Einschätzung der Prognose - mit der Anzahl der untersuchten Lymphknoten steigt. Eine andere Möglichkeit zur Abschätzung der Prognose ist die sogenannte Lymph Node Ratio (LNR). Sie gibt das Verhältnis von befallenen zu entnommenen Lymphknoten wieder. Eine LNR von  $\geq 0,2$  hat sich in mehreren Studien als prognostisch ungünstig erwiesen und soll ein stärkerer Prognoseparameter nach der Resektion als der reine Lymphknotenstatus sein [79, 80].

In Einzelfällen kann die Resektion des Pankreas trotz nachgewiesener Metastasierung zur Kontrolle der Symptome (z. B. bei Schmerzen, Ikterus) erfolgen. Bei ca. 80 % der Patienten beschränkt sich das therapeutische Vorgehen nur noch auf eine palliative Versorgung, da das Pankreaskarzinom bei Erstdiagnose bereits metastasiert ist. Die mittlere Überlebenszeit für Patienten mit Metastasen beträgt drei bis sechs Monate. Hier sollte die effektive palliative Betreuung zur Verbesserung der Lebensqualität im Vordergrund stehen und frühzeitig beginnen [81]. Bei Durchführung einer palliativen Chemotherapie mit Gemcitabin liegt die Ein-Jahres-Überlebensrate bei 18 bis 20 % [71]. Die palliative Kombinationstherapie aus Gemcitabin plus Erlotinib, als EGF-Tyrosinkinaseinhibitor, zeigt in einer Phase-III-Studie im Gesamtkollektiv eine statistisch signifikante Verbesserung des medianen Überlebens um etwa zwei Wochen zugunsten der Kombinationstherapie. Bei einem vergleichbaren Nebenwirkungsprofil lag das Ein-Jahresüberleben bei der Gruppe, die nur mit Gemcitabin behandelt wurde, bei 19 % versus 24 % in der Gruppe mit der Kombinationstherapie. In Subgruppenanalysen war der Unterschied im medianen Überleben nur bei Patienten mit metastasierter Erkrankung, nicht aber für Patienten mit lokal fortgeschrittenen, inoperablen Tumoren nachweisbar [82].

## **1.2 Tumorpathologie des Pankreaskarzinoms**

### **1.2.1 Pathophysiologie und Tumorstroma**

Den Ausgangspunkt des Pankreaskarzinoms bilden die nicht-invasiven Vorläuferläsionen, die aufgrund von Mutationen über verschiedene Zwischenstadien in ein invasives Adenokarzinom übergehen können [83]. Zu diesen Läsionen zählen die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN), die intraduktal papillär muzinöse Neoplasie (IPMN) oder die muzinös-zystische Neoplasie (MCN) [84]. Zu den am längsten bekannten und am häufigsten untersuchten Vorläuferläsionen gehören die PanINs, die anhand ihrer Morphologie und Molekulargenetik in low-grade und high-grade Stadien eingeteilt werden [85, 86].

Zum Verständnis der Pathophysiologie des Pankreaskarzinoms ist es unerlässlich, die ausgeprägte desmoplastische Reaktion des umliegenden Bindegewebes zu betrachten. Diese Reaktion ist gekennzeichnet durch die Ablagerung von verschiedenen Proteinen wie Fibronectin, Kollagenen oder "Secreted protein acidic and rich in cysteine" (SPARC) im Tumor selbst bzw. in der Extrazellulärmatrix (EZM). Sogenannte Pancreatic stellate cells (PSC) (pankreatische Sternzellen) und aktivierte Pankreas-assoziierte Fibroblasten fördern die Sekretion und Ablagerung der o. g. Substanzen [87]. Makrophagen und Lymphozyten, die durch den Tumorprozess im Sinne von Entzündungszellen rekrutiert werden, können die Fibroblasten und PSCs aktivieren und somit die desmoplastische Reaktion in einer gegenseitigen Reaktion unterhalten [88]. Die aktivierten und tumorassoziierten Fibroblasten unterstützen über eine Sekretion von "Fibroblast activation protein" (FAP) das invasive Tumorwachstum von Pankreaskarzinomzellen [89]. Die PSCs wiederum können "Vascular endothelial growth factor" (VEGF) und Matrix-Metalloproteasen (MMP) sezernieren und damit die Angiogenese und die Metastasierung des Pankreaskarzinoms beeinflussen [90]. Somit besteht ein sich selbst erhaltender Kreislauf zwischen Tumorzellen und PSCs [91].

### **1.2.2 Mechanismus der Metastasierung**

Das Pankreaskarzinom metastasiert auf zwei Hauptwegen: dem hämatogenen und dem lymphogenen Weg. Die Metastasierung läuft in Schritten ab. Zuerst kommt es zu einem Verlust der Zell-Zell Adhäsion. Die somit vom Gewebsverbund losgelösten Tumorzellen durchbrechen die Basalmembran (Invasion) und können sich innerhalb



des peripankreatischen und perineuralen Gewebes fortbewegen (Migration). So wird ein Eindringen in das Lymph- und Blutgefäßsystem (Intravasation) ermöglicht. Die Tumorzellen verteilen sich über das Gefäßsystem und können in den entsprechenden Zielgeweben wieder austreten (Extravasation). So können aus den hämatogen gestreuten Karzinomzellen Metastasen hervorgehen [44, 92].

### 1.3 Angiogenese

Angiogenese bedeutet Neuentwicklung bzw. Wachstum von kleinen Blutgefäßen (Kapillaren), die überwiegend durch Aussprossung aus einem bereits vorgebildeten Kapillarsystem entstehen. Als Ausgangspunkt der Angiogenese gelten die Endothelzellen, die alle Gefäße auskleiden. Von der Angiogenese zu unterscheiden ist die Vaskulogenese. Diese beschreibt die Entstehung bzw. Neubildung von Blutgefäßen aus den sogenannten endothelialen Vorläuferzellen in der frühen Embryogenese. Bei dieser Form differenzieren sich endotheliale Stamm- und Vorläuferzellen (Hämangioblasten, Angioblasten) zu Endothelzellen aus. Sowohl bei der Vaskulogenese als auch bei der Angiogenese differenzieren sich Zellen des umgebenden Mesenchyms entweder zu Perizyten (Kapillaren) oder zu glatten Muskelzellen (größere Gefäße) [93].

Die Angiogenese verläuft in mehreren Schritten. Zunächst kommt es über die Kaskade Stickoxid (NO) - Vasodilatation - VEGF zur Erhöhung der Kapillarpermeabilität [93]. Das Stickoxid wird von der im Gefäßendothel sitzenden NO-Synthase durch Oxidation von L-Arginin auf bestimmte Reize oder Hormone (Scher- und/oder Pulsationskräfte oder Acetylcholin, Bradykinin, Serotonin, Substanz P) gebildet [94, 95].

Das Angiopoetin-2 (ANG-2) ist ein Inhibitor des endothelspezifischen Tyrosinkinase-Rezeptors Tie-2 und ein Antagonist des natürlich vorkommenden Antipermeabilitätsfaktors Angiopoetin-1 (ANG-1) und verstärkt das Aussprossen von Endothelzellen durch die Hemmung des Endothelrezeptors. Das ANG-2 trägt zusätzlich zur Ablösung von glatten Muskelzellen von den Endothelzellen und zur Auflösung der extrazellulären Matrix bei. Bestimmte Proteasen aus dem umgebenden Gewebe zersetzen Teile des Zellstromas und der Basalmembran. Somit wird den proliferierenden Endothelzellen der Kontakt zur EZM und damit eine Aktivierung und Proliferation (Migration) ermöglicht.

Die bei der Auflösung der EZM beteiligten Proteasen ermöglichen darüber hinaus die Freisetzung von proangiogenen Mediatoren, wie z. B. VEGF, bFGF (basic fibroblast growth factor) und IGF-1 (insulin like growth factor). Diese führen zu einer Rekrutierung von Stromazellen und glatten Muskelzellen und ermöglichen es den Endothelzellen, die in die EZM einwachsen, solide Stränge zu bilden, welche nachfolgend ein Lumen ausbilden können [93, 96].

Die Angiogenese ist ein entscheidender Mechanismus, der sowohl für eine Reihe von physiologischen als auch pathologischen Reaktionen wichtig ist. Unter physiologischen Bedingungen findet die Angiogenese zum Beispiel bei der Wundheilung und im Reproduktionstrakt des weiblichen Organismus statt. Bei diesen Prozessen unterliegt die Angiogenese einem fein abgestimmten Zusammenspiel von angiogenen und antiangiogenen Faktoren (hierzu Tabelle 5) und wird streng reguliert [97]. Kommt es zu einer Fehlregulation dieser Faktoren, läuft die Angiogenese unreguliert ab. Solches wird bei einer Vielzahl von Krankheitsbildern beobachtet, wie z. B. bei der rheumatoiden Arthritis, Psoriasis, Leberzirrhose sowie der diabetischen Retinopathie. Beim Wachstum und bei der Metastasierung von soliden Tumoren ist diese Beobachtung von größter Bedeutung [98].

**Tabelle 5: Beispiele endogener angiogener und antiangiogener Faktoren**

Angiogene Faktoren	Antiangiogene Faktoren
Angiogenin	Angiopoietin-2
Adenosin	VEGFR-3
Angiopoietin-1	Antiangiogenic antithrombin III
Epidermal growth factor	Endostatin
Fibroblast growth factor: acid (aFGF), basic (bFGF)	Interferon $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$
Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)	Interleukin 1,-4,-12 (IL-1,-4,-12)
Hepatocyte growth factor (HGF)	Metalloproteinase inhibitor (TIMPs)
Interleukin 8 (IL-8)	Prolactin 16 kda fragment
Platelet-derived endothelial growth factor (PDGF)	Platelet factor 4 (PF4)
Prostaglandine E1, E2	Proliferin-related protein (PRP)
Transforming growth factor, (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ )	Thrombospondin-1, 2 (TSP-1, TSP-2)
Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )	Vasculostatin
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Vasostatin

(aus: [97])

Um den wachsenden Tumor mit ausreichenden Mengen an Sauerstoff sowie Nährstoffen zu versorgen, den Abtransport von Stoffwechselendprodukten und eine Metastasierung zu ermöglichen, ist die Angiogenese von essentieller Bedeutung. Die tumorstimulierte Bildung neuer Kapillaren ist eine der grundlegenden Voraussetzungen für das Tumorzellwachstum und die hämatogene Metastasierung [99]. Die durch den Tumor induzierte Angiogenese entsteht aufgrund des Missverhältnisses zwischen der Quantität der angiogenen und antiangiogenen Faktoren zugunsten der Erstgenannten. Die vermehrte Produktion und Sekretion (pro)angiogener Faktoren wird durch die Tumorzelle selbst gefördert und ist Ausdruck der ausgeprägten desmoplastischen Stromareaktion (siehe Kapitel 1.2.1). Das so entstandene Ungleichgewicht zwischen vermehrten angiogenen und reduzierten antiangiogenen Faktoren führt dazu, dass sich bislang avaskuläres hyperplastisches Gewebe in ein überschießendes vaskularisiertes Tumorgewebe entwickelt und möglicherweise in eine maligne Tumورprogression übergeht. Dies ist der sogenannte „angiogenic switch“ [100]. Dieser hat somit entweder die Stimulation angiogener oder die Hemmung antiangiogener Faktoren zur Folge und führt durch die Störung des Gleichgewichts der Faktoren zu einem Kontrollverlust über die lokale Angiogenese des gesamten Organismus [101]. Der „angiogenic switch“ ist Folge von genetischen und umweltbedingten Einflüssen. Zu den aktivierenden genetischen Faktoren zählen (Proto-) Onkogene wie das Sarcoma-Gen (Src) und Rat sarcoma-Gen (Ras). Inhibitorische Gene sind z. B. p53 und das von Hippel-Lindau-Gen. Zu den Umwelteinflüssen, welche die Angiogenese im Tumor auslösen können, gehören z. B. die Hypoxie, metabolischer Stress, Veränderungen im pH-Wert des Gewebes und Zytokine aus einer inflammatorischen Lokalreaktion [102].

Eine Vielzahl von angiogenen und antiangiogenen Faktoren sowie deren Rezeptoren, die im humanen Pankreaskarzinom zum Teil auch überexprimiert werden, wurden in den letzten Jahren identifiziert bzw. charakterisiert und dann als mögliche therapeutische Angriffspunkte definiert (hierzu Tabelle 6) [97, 102].

**Tabelle 6: Proangiogene Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, die im humanen Pankreaskarzinom überexprimiert werden**

Wachstumsfaktoren, die Tyrosinkinaserzeptoren aktivieren	Rezeptor
VEGF VEGF-C EGF, TGF- $\alpha$ FGF-1, -2 PDGF B chain IGF-I Hepatocyte growth factor	VEGFR-1, -2 VEGFR-3 EGF-R FGF-R-1, -2 PDGFR a & b IGF-I-R MET
Wachstumsfaktoren, die Serin-Thyreonin Rezeptoren aktivieren	Rezeptor
TGF- $\beta$ 1, -2, -3 Proangiogene Zytokine Interleukin-8	Typ2 TGF- $\beta$ Rezeptor CXCR-1 & CXCR-2

(aus: [102])

Bestimmte angiogene Faktoren korrelieren mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer ungünstigeren Prognose [103]. Ein nicht vaskularisierter solider Tumor hat die Möglichkeit, eine Größe von max. 1mm im Durchmesser zu erlangen. Danach kann das Tumorgewebe die benötigten Nährstoffe nicht mehr nur über Diffusion aufnehmen. Für den An- und Abtransport wird ein Gefäßsystem benötigt. Eine Arbeit konnte zeigen, dass das initiale Tumorstadium beim Adenokarzinom des Pankreas zunächst keine Angiogenese benötigt. Allerdings konnten schon am fünften Tag des Tumorstadiums intravitalmikroskopische Beweise für das Vorhandensein neuer Mikrogefäße im Sinne einer neu entstandenen Angiogenese erbracht werden [104]. Die Angiogenese und die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sind somit von essentieller Bedeutung für das Wachstums- und Metastasierungsverhalten des Pankreaskarzinoms. Mit diesem Wissen eröffnet sich an dieser Stelle eine neue therapeutische Möglichkeit, die die Inhibition der Tumoriangiogenese direkt am proliferierenden Tumorendothel ansetzen lassen könnte. Somit wäre der Therapieansatz selektiver und damit potentiell nebenwirkungsärmer als z. B. die systemische Chemotherapie.

#### 1.4 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor - VEGF

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor - VEGF - ist einer der bekanntesten angiogenen Faktoren. Er wird von Tumor- und Stromazellen gebildet. Zu den zwei stärksten Induktoren von VEGF gehören sowohl der epidermale Wachstumsfaktor (epidermal growth factor - EGF) als auch der Wachstumsfaktor TGF-alpha (transforming growth factor alpha) [105, 106]. Einen weiteren entscheidenden Einfluss auf die Ausschüttung von VEGF hat die Azidose und die damit einhergehende Hypoxie [107]. Es kommt unter dem Einfluss von VEGF zur Endothelzellproliferation und Ausdifferenzierung des Endothels als Vorstufe der neuen Gefäße. Weitere Aufgaben des VEGF liegen in der Migration und Invasion der Endothelzellen sowie in deren Erhaltung. So konnte VEGF als einer der Überlebensfaktoren für Endothelzellen identifiziert werden. *In vitro* Studien zeigten, dass VEGF den programmierten Zelltod (Apoptose) von Endothelzellen durch eine Reihe von Mediatoren, die auch die Induktion von antiapoptotischen Proteinen wie z. B. BCL-2 (B-Cell lymphoma) und A1 (einem Mitglied der antiapoptotischen BCL-2 Familie) beinhaltet, verhindert [108].

Die Wirkung des VEGF erfolgt über eine Bindung des Faktors an den Rezeptoren VEGF-Rezeptor1 (VEGF-R1) und VEGF-Rezeptor2 (VEGF-R2), die auf Endothelzellen exprimiert werden. Diese erscheinen erst nach ihrer Aktivierung durch VEGF in sehr großer Zahl auf der Oberfläche der Tumorendothelzellen. Beiden Rezeptoren wird jeweils eine zentrale Rolle bei der Regulierung der Neubildung und der Erhaltung von pathologischen Blutgefäßen zugeschrieben [109]. Eine große Anzahl an epithelialen Tumoren, hierzu gehört auch das Pankreaskarzinom, überexprimieren VEGF-R1 und VEGF-R2 auf ihren Tumorendothelzellen, wobei VEGF-R2 bei der Signalübertrag von entscheidender Bedeutung ist (hierzu Tabelle 6).

Ein vielfach untersuchter Wachstumsfaktor ist VEGF-C. Dieses prolymphangiogene Protein bindet an den Rezeptor VEGF-R3. Dieser Rezeptor ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor, der die Lymphangiogenese *in vivo* (während der Embryonalzeit und auch im ausgewachsenen Organismus) und die Lymphendothelzellproliferation *in vitro* vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass transgene Mäuse, die VEGF-C in den Beta-Zellen des Pankreas überexprimieren, eine extensive Lymphangiogenese um die Langerhans-Inseln herum entwickelten. Wurden nachfolgend Tumoren in diesem überexprimierenden Gewebe induziert, zeigte sich eine Metastasierung der

Tumorzellaggregate in benachbarte Gebiete, während Tumoren aus nicht transgenen Mäusen keine Metastasen entwickelten [110, 111]. Eine andere Arbeit konnte zeigen, dass eine vermehrte Expression von VEGF beim Pankreaskarzinom mit einer schlechteren Prognose assoziiert war [112].

### **1.5 Mikrogefäßdichte - microvessel density (MVD)**

Die Mikrogefäßdichte (MVD) im Präparat eines Tumors wird in vielen Tumorsystemen als Maß für den Einfluss der proangiogenen Faktoren herangezogen und korreliert zum Teil mit dem Ausmaß und Fortschritt der Tumorerkrankung und der allgemeinen Prognose [113]. Bei Messungen der Mikrogefäßdichte, die als einer der Marker für die Angiogenese des Pankreaskarzinoms fungiert, zeigte sich, dass die Mikrogefäßdichte in der Peripherie des Tumors, am Ort des Tumorwachstums, ausgeprägter war als im Zentrum. Eine ausgeprägtere Mikrogefäßdichte kann mit einem stärkeren Tumorwachstum, einer erhöhten Metastasierungstendenz und einem geringeren Differenzierungsgrad der Tumorzellen einhergehen [114, 115]. Sowohl Pankreaskarzinomzellen als auch die umliegenden Stromazellen tragen über eine Expression von VEGF und anderer Faktoren zur Ausbildung einer erhöhten MVD bei. Diese ist mit einem erhöhten Auftreten von Lebermetastasen und einem verringerten medianen Überleben assoziiert [116]. Eine andere Arbeit zeigte, dass bei vermehrter Expression von VEGF die MVD stieg und sich daraus eine schlechtere Prognose bei vermehrter MVD ergab [112]. Somit ist die Mikrogefäßdichte ein weiterer wichtiger Parameter für die Prognose des Pankreaskarzinoms.

## **1.6 Stress und Stresshormone**

### **1.6.1 Stress**

Ursachen für Stress können verschiedene innere Reize (z. B. Verlust, Misshandlung, Depression, Arbeitslosigkeit, familiäre Probleme, Ängste, Entscheidungskonflikte, Leistungsüberforderung) als sogenannte psychologische Stressoren oder äußere Reize (z. B. Lärm, Isolation, Zeitdruck, Trauma, Operation, Infektionen) als sogenannte physische Stressoren sein [117]. Diese Stressoren führen über die Veränderung des Gleichgewichtes des Organismus zu einer Stressreaktion, die es

dem Individuum ermöglichen soll, sich den neuen Umweltbedingungen anzupassen und zu überleben. Diesen Anpassungsprozess bezeichnet man als Allostase [118, 119].

Die Einteilung von Stress erfolgt in "akuten" und "chronischen" Stress. Beim akuten Stress erfolgt eine physiologische Reaktion des Organismus, um schnell Energie bereitzustellen und die Leistung des Immunsystems zu erhöhen, um damit die Reaktions- und Widerstandsfähigkeit anzupassen und das Überleben des Individuums zu sichern [119]. Der Organismus hat anschließend die Möglichkeit sich durch entsprechende Mechanismen vom akuten Stress zu erholen. Beim chronischen Stress wird der Organismus durch andauernde und/oder wiederholte Belastungen gereizt. Eine Möglichkeit zur Regeneration besteht jedoch nicht, und somit kann der chronische Stress über die Beeinträchtigung physiologischer Funktionen (wie z. B. die Wundheilung oder das Immunsystem) zur Schwächung des Organismus und zur Entstehung von Krankheiten beitragen [120, 121].

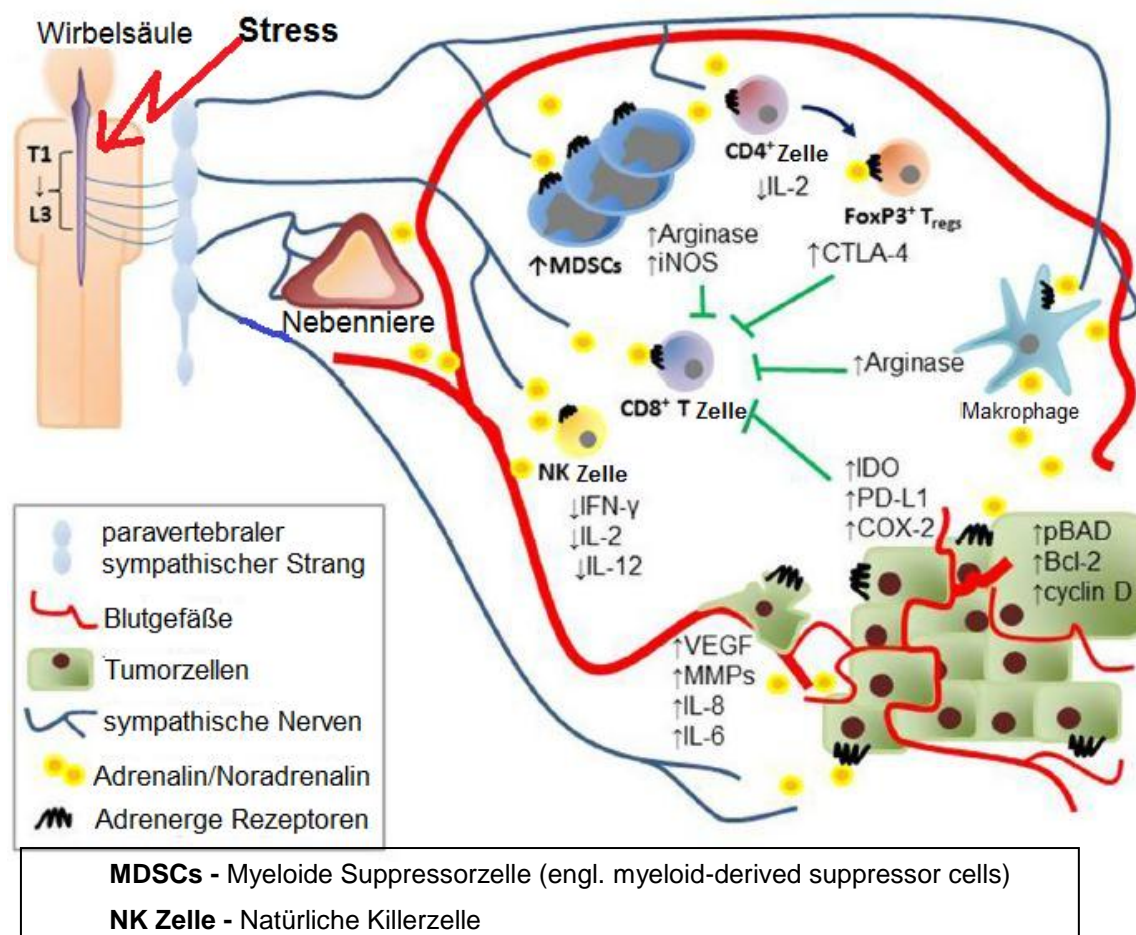
In der heutigen Zeit kommt es neben schweren psychischen Belastungssituationen, wie z. B. langen und unsicheren Lebensphasen mit andauernden Sorgen und Ängsten, auch immer häufiger zu vielen kleineren Belastungen im Alltag. Diese können bei Fehlen von geeigneten Anpassungs- oder Verarbeitungsstrategien eine nicht unerhebliche Wirkung auf unser Wohlbefinden und somit auf das Entstehen von Krankheiten und psychischen Störungen haben.

### **1.6.2 Stresshormone und die Wechselwirkung mit der Karzinogenese**

Kommt es im Organismus durch die o. g. Stressoren zu einer Stresssituation, werden über bestimmte endokrine Regulationsmechanismen nicht nur Stresshormone wie Katecholamine (Adrenalin = Epinephrin und Noradrenalin = Norepinephrin) und Cortisol ausgeschüttet, sondern auch Wachstumshormone, adrenocorticotrope Hormone (ACTH) und Prolaktin [122]. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein durch Stress ausgelöstes (Lebens-) Ereignis eine erhöhte Konzentration von Katecholaminen im Tumor bedingt und *in vivo* mit einem Tumorprogress einhergehen kann [123-125]. Dieser Mechanismus wurde hierbei durch die Katecholamine, die in Karzinomzellen unterschiedlicher Herkunft die Sekretion von MMP-2, MMP-9, VEGF und Interleukinen erhöhen, ausgelöst [126-128]. Auch eine gesteigerte Angiogenese durch die von Katecholaminen verstärkte Sekretion von VEGF konnte nachgewiesen werden [128]. Eine weitere Arbeit zeigte, dass bei einem orthotopen murinen

Ovarialkarzinom die Angiogenese unter dem Einfluss chronischen Stresses deutlich zunahm und nachfolgend zu einem erhöhten Tumorwachstum führte [129].

Durch die Stimulation von MMP-2 und MMP-9 kann bei Zellen *in vitro* und bei Karzinomen *in vivo* das Wachstum und die Invasivität erhöht werden. Eine durch Stress induzierte Suppression der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und die damit einhergehende Hemmung des Immunsystems kann ebenfalls zu einem vermehrten Tumorwachstum führen [130, 131]. Die Abbildung 1 stellt diesen Sachverhalt schematisch dar. Durch Stress kommt es über eine Aktivierung des sympathischen Nervenstranges zur Produktion von verschiedenen Neurotransmittern und Hormonen, die sich anschließend über verschiedene Mechanismen auf das Tumormikromilieu und das Immunsystem auswirken [132].



**Abb. 1: Stressinduzierte Produktion verschiedener Neurotransmitter und Hormone und deren Auswirkung auf das Tumormikromilieu**

Stress wirkt auf den Körper ein und aktiviert den sympathischen Strang. Über diesen werden nicht nur die Nebennieren, sondern auch direkt verschiedene Zellen aktiviert. So kommt es zu einer Ausschüttung von verschiedenen Hormonen und Neurotransmittern, die nachfolgend über verschiedene Mechanismen das Tumormikromilieu beeinflussen (aus: [132] modifiziert nach Bruns).



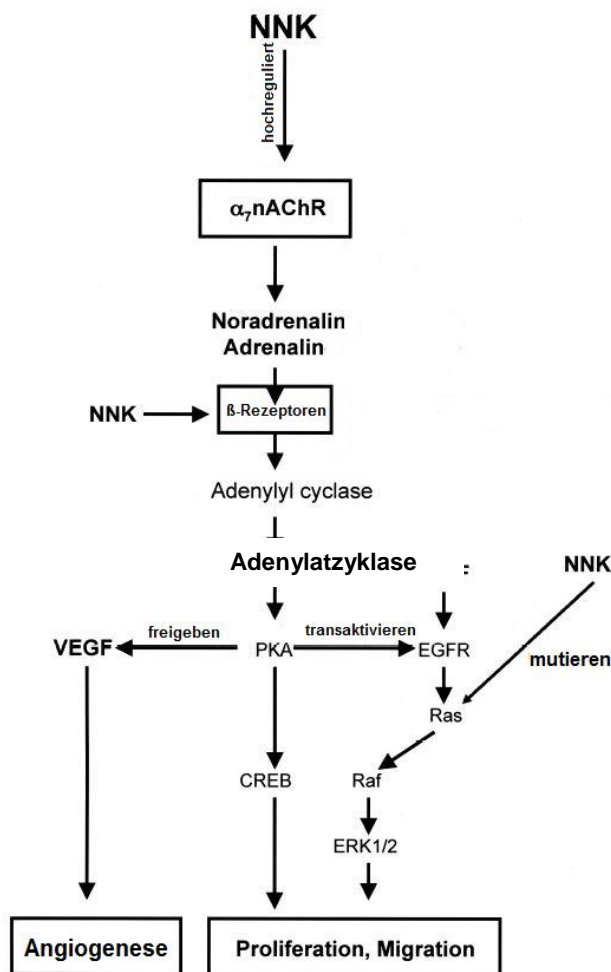
### 1.6.3 Stress/Stresshormone beeinflussen das Pankreaskarzinom

Die Zellen des Pankreaskarzinoms exprimieren  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Adrenorezeptoren ( $\beta$ -Ars) und werden durch die stressassoziierten Hormone/Neurotransmitter, wie z. B. die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin, zur verstärkten Proliferation und Migration angeregt [133].

In einer Arbeit wurde der Effekt von Noradrenalin auf humane Pankreaskarzinomzellen der Zelllinien MiaPaCa-2 und BxPc-3, die beide sowohl  $\beta$ 1- als auch  $\beta$ 2-Adrenorezeptoren exprimieren, untersucht. Bei der Zelllinie MiaPaCa-2 zeigte sich eine konzentrationsabhängige Wirkung von Noradrenalin auf die Invasivität der Zellen, die durch eine erhöhte Expression von MMP-2 und -9 sowie VEGF nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse der Arbeit legten nahe, dass die Entstehung von Metastasen nicht nur genetisch bedingt war, sondern auch äußeren Einflüssen, wie z. B. Noradrenalin, welches als Signalgeber auch im Tumormikromilieu vorhanden war, unterliegen könnte [134].

Eine andere Arbeit zeigte, dass das Wachstum der Zellen des humanen Pankreaskarzinoms und der duktaalen Pankreasepithelzellen *in vitro* über die Stimulation durch  $\beta$ -Adrenorezeptor-Agonisten beeinflusst werden kann. Die Signalkaskade wird über die Aktivierung der Adenylatzyklase durch die  $\beta$ -Adrenorezeptoren ( $\beta$ -Ars) eingeleitet und führt anschließend über eine spezielle Signalkaskade zur Stimulation der Tumorangiogenese, -proliferation und -migration. Die genaue Signalkaskade wird in Abbildung 2 dargestellt. In ebendieser Arbeit wurde weiterhin gezeigt, dass 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon oder „Nicotine-derived nitrosamine ketone“ (NNK) als Beta-Adrenorezeptoragonist wirkt [135]. NNK ist ein Karzinogen, welches beim Tabakrauchen entsteht. Es wird vermutet, dass NNK über genotoxische Effekte bei der Entstehung von Neoplasien mitwirkt. In einer vorangehenden Arbeit von Guo et al. konnte bereits nachgewiesen werden, dass es über  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Adrenorezeptoren zu einer Stimulation der Proliferation von Lungen- und Pankreasadenokarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* kam [134]. Eine andere Arbeit der Autoren zeigte an immortalisierten humanen duktaalen Pankreasepithelzellen der Zellreihe HPDE6-c7 eine ähnliche Wirkweise von NNK. Hierbei konnte der Effekt von NNK durch die Transaktivierung von EGF-Rezeptoren, erhöhtem intrazellulärem cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) und der Phosphorylierung der Kinase ERK-1 und ERK-2 (extracellular-signal regulated kinases) nachgewiesen werden [136].

Dieser Zusammenhang konnte durch die Arbeit von Al-Wadei et al. bestätigt werden. Hier wurde über eine signifikante Steigerung des  $\alpha 7$ -nikotinergen Acetylcholinrezeptors ( $\alpha 7$ nAChR) im humanen Pankreaskarzinom durch NNK dieselbe Signalkaskade aktiviert wie bei den Katecholaminen. NNK und  $\alpha 7$ nAChR sind somit ein vorgeschalteter Schritt. Es erfolgte auch eine direkte Beeinflussung der  $\beta$ -Adrenorezeptoren durch NNK. Diese Sachverhalte werden ebenfalls in Abbildung 2 dargestellt [135].



**Abb. 2: Wirkung der Katecholamine und NNK: über  $\beta$ -Adrenorezeptor ( $\beta$ -Ar) stimulierte Signalkaskade zur Beeinflussung des Tumorwachstums**

NNK und  $\alpha 7$ nAChR fungieren als vorgeschaltete Signale zur Stimulierung von Noradrenalin und Adrenalin oder als direkter  $\beta$ -Rezeptor-Agonist. Die durch Stress freigesetzten Neurotransmitter Adrenalin und Noradrenalin binden am  $\beta$ -Ar und führen über die Aktivierung der Adenylatzyklase zur Erhöhung von intrazellulärem cAMP. cAMP ermöglicht die Freisetzung von epidermal growth factor (EGF) und aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche a) den Transkriptionsfaktor CREB phosphoryliert, b) zur Freisetzung von VEGF führt und c) den EGF-Rezeptor (EGF-R) transaktiviert. Die Signalkaskade endet in der vermehrten Angiogenese, Proliferation und Migration von Tumorzellen (aus: [135], modifiziert nach Bruns).

Somit können die Katecholamine und NNK auf der einen Seite durch die  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren die Proliferation und Invasivität der Pankreaskarzinomzellen erhöhen, während auf der anderen Seite dieser Effekt durch  $\beta$ -Adrenorezeptor-Antagonisten blockiert werden könnte [137]. Es zeigte sich, dass unter allen Patienten mit einer Karzinomerkkrankung die Patienten mit einem Pankreaskarzinom die stärksten psychologischen Stresssymptome wie Angst und Depression aufwiesen [138] und deshalb der Stress und die daraus entstehenden Stresshormone gerade beim Pankreaskarzinom eine hohe Bedeutung bei der Karzinogenese besitzen könnten.

## **1.7 Die Intravitalmikroskopie (IVM)**

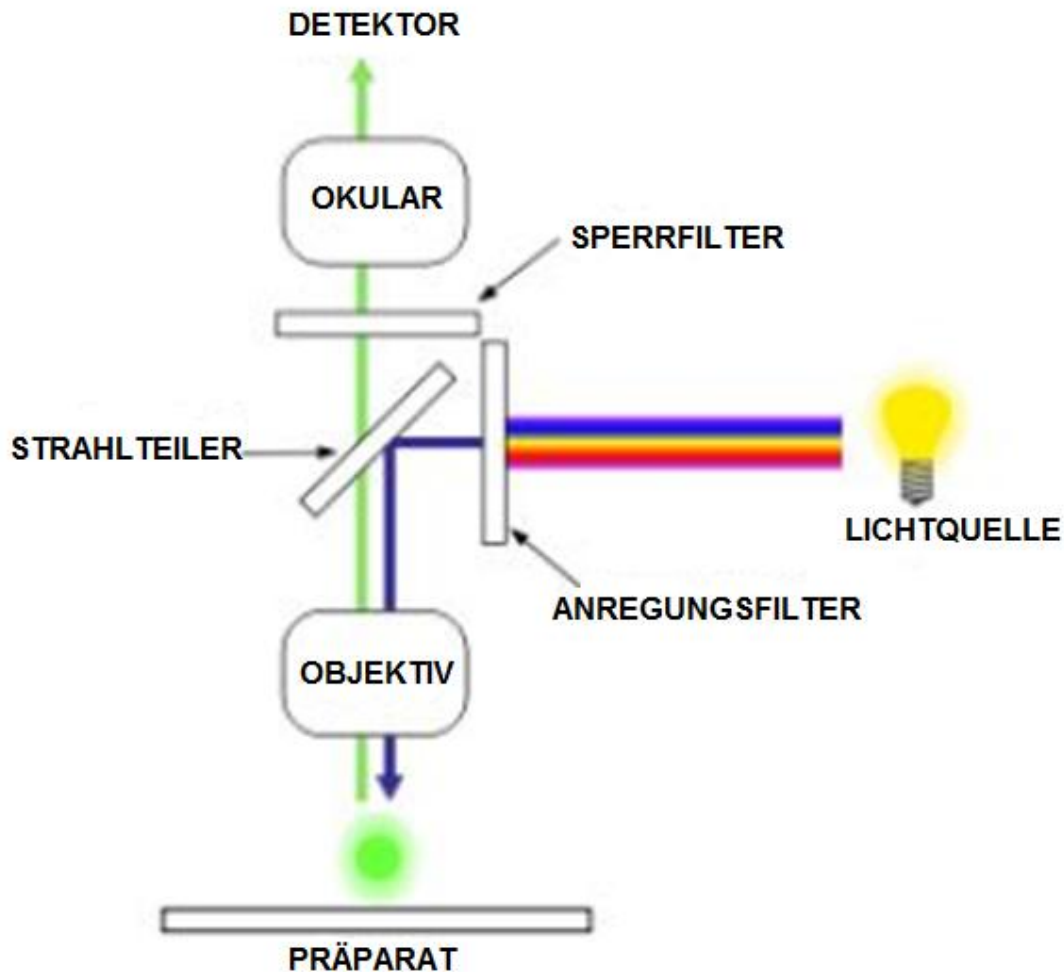
### **1.7.1 Die Geschichte der Intravitalmikroskopie**

Die ersten intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden bereits im Jahr 1839 durchgeführt. In diesen Untersuchungen konnten erste Eindrücke der Perfusion sowie Zell-Zell-Interaktionen in leicht zugänglichen Geweben, wie z. B. dem Mesenterium, verschiedener Spezies gewonnen werden. Ein Jahrhundert später folgten weitere intravitalmikroskopische Beobachtungen der Mikrozirkulation. Hier konnte mit Hilfe der Transillumination an dünnsschichtigen Geweben, wie z. B. der Schwimmhaut des Frosches, am Kaulquappenschwanz, an Fledermausflügeln oder an der Maus, eine Untersuchung der Mikrozirkulation erfolgen [139-141]. Im Jahr 1967 wurde die intravitalmikroskopische Fluoreszenzmikroskopie durch Köhler eingeführt. Nun konnte man auch an soliden Organen, wie z. B. Leber, Gehirn und Lunge, die Mikrozirkulation untersuchen [142-144]. Ein Fluoreszenzfarbstoff konnte durch Kontrastierung eine *in vivo* Darstellung bestimmter Zellen hervorrufen und somit die direkte Analyse von Mikrozirkulationsparametern ermöglichen [145, 146]. Ricker prägte im Jahre 1924 die Mikrozirkulation der Peripherie mit dem Begriff der Endstrombahn, deren Aufgabe die Erhaltung des Gewebes sei [147]. Der Begriff der Mikrozirkulation umfasste einspeisende Arteriolen, die Kapillaren als Gewebepерfusionsfläche, die drainierenden Venolen und die Lymphgefäße [148]. In diesem Austauschsystem soll der überwiegende Teil des Stoffaustausches zwischen Blut und Interstitium stattfinden und ist dadurch mit der Anlieferung von Nährstoffen von großer Bedeutung für die Gewebephysiologie [149]. Auf diese Weise

konnten durch die neue Methode der intravitalmikroskopischen Untersuchung vielfältige und tiefgreifende neue Erkenntnisse im Bereich der Mikrozirkulation gewonnen werden.

### **1.7.2 Die Grundlagen der Intravitalmikroskopie**

Der Mechanismus des Epifluoreszenzmikroskops beruht auf dem physikalischen Effekt der Fluoreszenz. Hierbei absorbieren Moleküle, sogenannte Fluorophore, Licht einer bestimmten Wellenlänge und emittieren dann Licht einer anderen (längerwelligen) Wellenlänge. Die Verwendung von Fluoreszenzmarkierungen ermöglicht die Lokalisierung bestimmter Bestandteile komplexer biomolekularer Strukturen, inklusive der Endothelzellen bzw. kleiner Gefäße und Stammzellen. Die Lichtquelle des Mikroskops liefert Licht, das Wellenlängen aus dem gesamten Lichtspektrum enthält und anhand eines dichromatischen Spiegels in seine Spektralfarben zerlegt wird. Der Anregungsfilter dient dazu, dass nur Licht mit der für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs notwendigen Wellenlängen (z. B. blaues Licht) hindurch gelangt. Der Spektrumbereich, in dem der Fluoreszenzfarbstoff leuchtet, darf nicht durchgelassen werden. Ein Strahlteiler spiegelt das Anregungslicht zum Objektiv. Dieses nahezu einfarbige Licht erreicht das Präparat und regt die Fluoreszenz an, sodass Licht einer größeren Wellenlänge (in diesem Fall grünes Licht) emittiert wird. Dieses Licht gelangt erneut zum Strahlteiler und durch dessen besondere Eigenschaften wird das nun längerwellige Licht Richtung Okular durchgelassen (und nicht gespiegelt). Der Lichtstrom fließt anschließend durch den Sperrfilter, der nur das durch das Präparat emittierte längerwellige (grüne) Fluoreszenzlicht durchlässt und das noch vorhandene blaue Anregungslicht (Strahlteiler arbeiten nicht ganz effektiv und so gelangt ein geringer Teil des im Präparat reflektierten Anregungslichts in Richtung Okular) absorbiert. Abschließend kommt es zur Entstehung des Bildes, wobei Objektdetails in der Farbe des entsprechenden Fluoreszenzlichtes auf dunklem Hintergrund erscheinen. Die Abbildung 3 zeigt die genannten Grundprinzipien eines Epifluoreszenzmikroskops [150].



**Abb. 3: Grundprinzipien eines Epifluoreszenzmikroskops**

Dargestellt sind die Grundprinzipien eines Epifluoreszenzmikroskops. Die Lichtquelle des Mikroskops liefert Licht, das Wellenlängen aus dem gesamten Lichtspektrum enthält und anhand eines dichromatischen Spiegels in seine Spektralfarben zerlegt wird. Der Anregungsfilter dient dazu, dass nur Licht mit der für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs notwendigen Wellenlängen (z. B. blaues Licht) hindurch gelangt. Der Spektrumbereich, in dem der Fluoreszenzfarbstoff leuchtet, darf nicht durchgelassen werden. Ein Strahlteiler spiegelt das Anregungslicht zum Objektiv. Dieses nahezu einfarbige Licht erreicht das Präparat und regt die Fluoreszenz an, sodass Licht einer größeren Wellenlänge (in diesem Fall grünes Licht) emittiert wird. Dieses Licht gelangt erneut zum Strahlteiler und durch dessen besondere Eigenschaften wird das nun längerwellige Licht Richtung Okular durchgelassen (und nicht gespiegelt). Der Lichtstrom fließt anschließend durch den Sperrfilter, der nur das durch das Präparat emittierte längerwellige (grüne) Fluoreszenzlicht durchlässt und das noch vorhandene blaue Anregungslicht (Strahlteiler arbeiten nicht ganz effektiv und so gelangt ein geringer Teil des im Präparat reflektierten Anregungslichts in Richtung Okular) absorbiert (aus: [150] modifiziert nach Bruns).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Die Forschungsbemühungen für das Pankreaskarzinom des letzten Jahrzehnts konzentrierten sich besonders auf die Interaktionen von Zellen, Wachstumsfaktoren und Signalkaskaden des Tumormikromilieus sowie deren Bedeutung für die Karzinogenese. Dabei lag der Fokus im Besonderen auf der Tumorentstehung und dem -wachstum, der Migration sowie der Angiogenese und Metastasierung des Pankreaskarzinoms. Hierbei scheinen VEGF und die Mikrogefäßdichte (MVD) eine hohe Bedeutung bei der Entstehung und für die Prognose des Pankreaskarzinoms zu haben. Auch der Einfluss durch chronische Stressoren, ob nun psychologische oder physiologische, trägt entscheidend zur Tumorentstehung und zum -progress mit einhergehender schlechter Prognose bei.

In den zurückliegenden Arbeiten unserer chirurgisch-onkologischen Arbeitsgemeinschaft konnte der Einfluss sowohl von VEGF als auch von chronischem Stress auf die Karzinogenese *in vitro* auf zellulärer Ebene gezeigt werden. Mit der in dieser Arbeit neu etablierten intravitalmikroskopischen Untersuchung sollte ein neues Mittel zur Betrachtung der Mikrogefäßdichte, als Ausdruck der Angiogenese und des Tumorprogresses, *in vivo* erschlossen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte im ersten Schritt eine Methode zur *in vivo* mikroskopischen / intravitalmikroskopischen Untersuchung am murinen orthotopen syngenesischen Pankreaskarzinom entwickelt werden. Im nächsten Schritt sollte der Einfluss chronischen Stresses auf die Angiogenese, gemessen mit der Mikrogefäßdichte durch die Intravitalmikroskopie, und auf das Tumorwachstum, gemessen durch ein Kleintier-MRT, untersucht werden.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, den Effekt chronischen Stresses auf die Angiogenese und damit auf das Tumorwachstum *in vivo* zu untersuchen und zu zeigen, dass chronischer Stress einen negativen Einfluss (i. S. einer erhöhten Mikrogefäßdichte und eines erhöhten Tumorwachstums) auf die Prognose des murinen orthotopen syngenesischen Pankreaskarzinoms der Zelllinie 6606-PDA haben könnte.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Aqua destillata	Delta Select, Pfullingen
Desinfektionsmittel Sterilium	BODE Chemie GmbH, Hamburg
Ethanol 70 %	Carl Roth, Karlsruhe
Growth Factor Reduced BD - Matrigel™ Matrix	BD Biosciences, Bedford, USA
Isotonische Natriumchlorid- lösung 0,9 %	Berlin-Chemie, Berlin
Ketanest S 25mg/ml	Pfizer, Berlin
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
Rompun 2%ige Injektionslösung	Bayer, Leverkusen
Terralin®Liquid	Schülke und Mayr, Norderstedt
Trypanblau-Lösung	Gibco cell culture, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Gibco cell culture, Karlsruhe

##### 3.1.2 Zellkulturmedium

Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco cell culture, Karlsruhe
Fetales Bovines Serum	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin	Gibco cell culture, Karlsruhe

##### 3.1.3 Zelllinie

Murine Zelllinie 6606-PDA	David Tuveson, Cold Spring Harbor, USA
---------------------------	---

##### 3.1.4 Kontrastmittel

FITC-Dextran (bovines) (5 %)	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim
------------------------------	-------------------------------

### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie	Handelsüblich
Bepanthen®- Augensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen,
Crème	Penaten®
Deckglas	Menzel Gläser, Braunschweig
Drucktransducer (1DT-XX-1)	Safedraw®, BD, Singapur
Einmalkanülen (20G, 26G, 27G)	NEOJECT®, Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
Einmalspritze (1ml)	BD Plastipak™, Heidelberg
Einmalspritzen (2ml, 5ml, 10ml)	BD Discardit™ II, Heidelberg
Einmalspritze Omnican® F (1ml)	B/Braun, Melsungen
Falcongefäß (15ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Falcongefäß (50ml)	BD, Heidelberg
Flüssigkleber	UHU GmbH & Co KG., Bühl
Glasabsaugpipette	VWR, Wien, Österreich
Hamiltonspritze (25µl)	Hamilton, Reno, NV, USA
Kulturschalen (10cm)	Greiner, Frickenhausen
Mullkompressen Gazin® (5 x 5 cm²)	Lohmann & Rauscher, Neuwied
Neubauer Zählkammer	Braun, Melsungen
Objektträger (76 x 26 mm²)	Wilke, Hamburg
Perfusorleitung Injectomat Line	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Perfusorspritze OPS (50ml)	Luer Lock B/Braun, Melsungen
Pflasterstreifen Leukoplast Hospital	BSN medical GmbH, Hamburg
Pipetten Research® und Research plus® (100µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfe Pipetboy	Hirschmann, Eberstadt
Polyestergarn	Coats Duet, Salach
Portexschlauch Non sterile	SIMS Portex London, England
- 0,28mm ID/0,61mm OD	
- 0,58mm ID/0,96mm OD	
- 0,75mm ID/1,22mm OD	
Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg
Venenverweilkanüle 26G	BD Vasculon™ Plus, Heidelberg



Vicryl 4/0 = Polyester weiß DS16 4/0	Catgut GmbH, Markneukirchen
Videokassette (240min)	FujiFilm, Düsseldorf
Wattestäbchen	Care & Serve, WIROS GmbH, Willich

### 3.1.6 Instrumente/chirurgisches Besteck

Gefäßweiter	Selbsterstellung aus 27G Kanüle
Mikro Federschere	aesculap® B/Braun, Melsungen
Mikro Pinzette	aesculap® B/Braun, Melsungen
Mikro Pinzette micro 2000	medicon instruments, Tuttlingen
Mikro Gefäßklemme	medicon instruments, Tuttlingen
Nadelhalter	aesculap® B/Braun, Melsungen
OP-Klemme	Roth, Karlsruhe
Pinzette, anatomisch	Roth, Karlsruhe
Pinzette, chirurgisch	Roth, Karlsruhe
Pinzette spitz	Roth, Karlsruhe
Pinzette stumpf	Roth, Karlsruhe
Schere gebogen	aesculap® B/Braun, Melsungen
Schere, Wagner Schere fein	medicon instruments, Tuttlingen

### 3.1.7 Laborgeräte

Additive Technik zur IVM	siehe unter Punkt 3.2.5.4.4
Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Digitalkamera PowerShot SX40HS	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Haushaltswaage	Soehnle, Leifheit AG, Nassau/Lahn
Intensivmonitorsystem HP	Hewlett Packard, Model66S, Böblingen
Lampe Novaflex	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Mikroskop	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Mikroskop	Zeiss, Jena
Monitor Ikegami	Ikegami Electronics®, Maywood, USA
Perfusor segura FT	Braun, Melsungen, Deutschland

Personalcomputer mit Software	Handelsüblich
CapImage	
Reagenzglasschüttler Vortex VF 2	Jahnke & Kunkel, Staufen
Sicherheitsabsaugpumpe	HLC Laborgeräte, München
Sterilwerkbank HeraSafe	Heraeus, Hanau
Sterilisator	Memmert, Schwabach
Stressanlage	Selbstbau, Bernstorff/Partecke et al.
Temperaturmesssonde (rektal)	Mallinckrodt Medical Incorp., Hazelwood, MO, USA
Videorekorder Sony-DV-Recorder	Sony Europe Limited, Berlin
Wasserbad	GFL, Großburgwedel
Wärme-/Heizunterlage	ThermoLux, Witte & Sutor, Murrhardt
Zentrifuge, Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Labofuge I	Heraeus, Hanau

### 3.1.8 Software

CapImage	Firma Zeintel, Heidelberg
GraphPad Prism (Version 5.01)	GraphPad Software, San Diego, USA
Microsoft Excel & Word	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
MIPAV (medical imaging processing and visualisation)	Center for Information Technology, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

### 3.1.9 Kleintier-MRT

7 Tesla MRT für Kleintiere	Bruker, ClinScan, 7,0Tesla, 290m Tesla/m Gradienten Stärke, Ettlingen
Ganzkörper-Maus-Spule	Bruker, Ettlingen

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Genehmigung

Die Tierversuche wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz vor der Durchführung von der zuständigen Behörde, dem Landesveterinäramt und dem Lebensmitteluntersuchungsamt Mecklenburg-Vorpommern mit dem Aktenzeichen LALLF M-V/TSD/7221.3-2.4-031/08 genehmigt. Die Versuchsreihe wurde sowohl im Biotechnikum in der Walther-Rathenau-Straße, Greifswald, das durch die Universität Greifswald angemietet wird, als auch im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universität Greifswald durchgeführt.

### 3.2.2 Tiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere wurden C57BL/6N Mäuse verwendet. Diese wurden von *Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH* in Bad Sulzfeld, Deutschland bezogen. Die Versuchstiere waren bei der Durchführung der Versuche ca. 8 Wochen alt, weiblich und wogen ca. 20g. Die Tierhaltung erfolgte bei 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus in den dafür vorgesehenen Käfigen (Makrolonkäfige, Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) in Gruppengrößen von sechs bis sieben Tieren pro Käfig. Ausgestattet wurde der Käfig mit 200g Einstreu (Lignocel®, Naturholzfaser), M-Z Extrudient (Alleinfutter für Mäuse in pelletierter Form; ssniff Spezialdiäten GmbH) und Wasser. Der freie Zugang zur Nahrung und zum Wasser war jederzeit gewährleistet. Gehalten wurden die Versuchstiere im Biotechnikum in der Walther-Rathenau-Straße, Greifswald. Vor der Durchführung der Experimente wurden die Versuchstiere eine Woche lang unter gleichen Rahmenbedingungen im Tierstall eingewöhnt, sodass gleiche Versuchsbedingungen gewährleistet waren.

Die Versuchstiere wurden randomisiert in folgende vier Gruppen mit jeweils sieben Versuchstieren je Gruppe eingeteilt:

- 1. Gruppe: Versuchs-/Stressgruppe mit 4 Wochen Stress
- 2. Gruppe: Kontrollgruppe 4 Wochen
- 3. Gruppe: Versuchs-/Stressgruppe mit 6 Wochen Stress
- 4. Gruppe: Kontrollgruppe 6 Wochen.

Die Versuchs-/Stress- und die Kontrollgruppen wurden voneinander getrennt in zwei gesonderten Räumen gehalten. Alle Versuchstiere wurden wöchentlich gewogen. Die nähere Beschreibung bzw. Erläuterung der vier Gruppen erfolgt unter *Punkt 3.2.5.2 Das physische Stressmodell*. Alle Tierversuche wurden unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

### **3.2.3 Das Versuchsmodell**

Der Versuchsablauf gliederte sich in drei Schritte mit einem Zwischenschritt für die Gruppen eins und zwei und einem extra Endschritt für die Gruppen drei und vier.

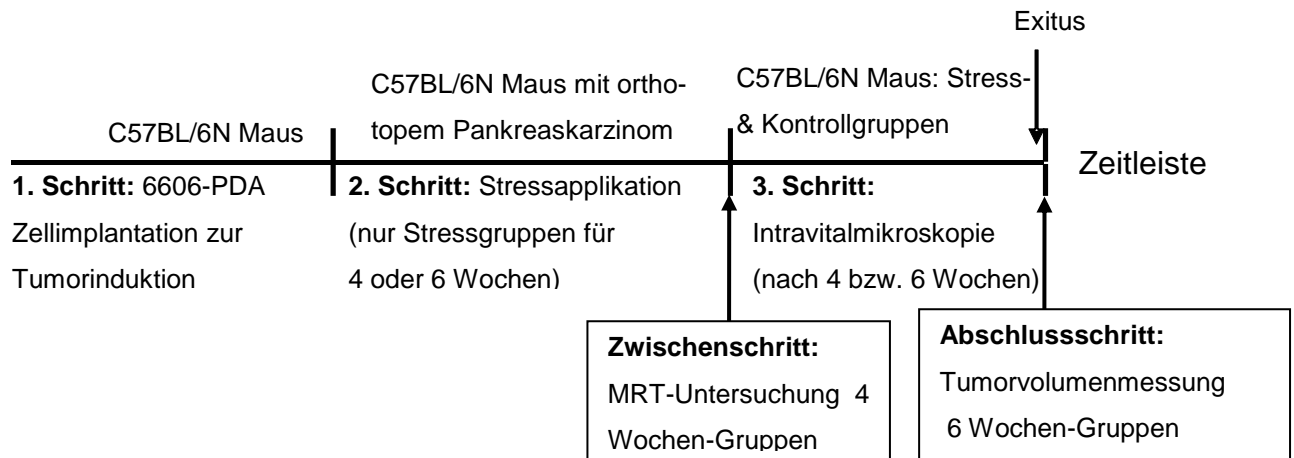
Der Versuchsablauf gliederte sich wie folgt (siehe Abb. 4):

Der erste Schritt des Versuchsablaufs befasste sich mit der orthotopen syngenesischen Pankreaskarzinominduktion in dem Versuchstier. Zuerst erhielt das Versuchstier eine Narkose und anschließend wurden dem Versuchstier in einer Operation Pankreaskarzinomzellen der murinen Zelllinie 6606-PDA in den Pankreaskopf injiziert, sodass im Verlauf ein murines orthotopes syngenes Pankreaskarzinom entstehen konnte (siehe *Punkt 3.2.5.1*).

Im zweiten Schritt des Versuchsablaufs wurden die Gruppen eins und drei unter Stress gesetzt. Hierbei wurden die Versuchstiere entweder vier oder sechs Wochen zweimal täglich über eine vorgegebene Zeit lang akustischen und räumlichen Stressfaktoren ausgesetzt (siehe *Punkt 3.2.5.2*).

In einem Zwischenschritt für die Gruppen eins und zwei wurde eine MRT-Untersuchung durchgeführt (siehe *Punkt 3.2.5.3*).

Im dritten Schritt des Versuchsablaufs wurde bei allen Gruppen die Intravitalmikroskopie durchgeführt (siehe *Punkt 3.2.5.4.5*). Nach erfolgter Intravitalmikroskopie wurde bei den Gruppen drei und vier das Pankreaskarzinom heraus präpariert und vermessen (siehe *Punkt 3.2.5.5*).



**Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs**

### 3.2.4 Zellbiologische Methode

Sämtliche Arbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle für die Zellkultur benötigten Materialien waren steril verpackte Einmalartikel.

#### 3.2.4.1 Zellkultur

Als Zellreihe für die Versuchsreihe dienten die Pankreaskarzinomzellen der murinen Zelllinie 6606-PDA [151]. Die Zellen der murinen Zelllinie 6606-PDA wurden initial aliquotiert und in einem adäquaten Kulturmedium, versetzt mit dem Kälteschutzmittel Dimethylsulfoxid (DMSO), kryokonserviert. Die Lagerung der Zellsuspension erfolgte in Röhrchen aus Polypropylen bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Bei Bedarf wurden die Zellen aufgetaut und in Kultur genommen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit.

#### 3.2.4.2 Herstellung des Kulturmediums

Zur Kultivierung der adhärent wachsenden Zellkultur wurde ein Gemisch aus 500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und 50 ml fetalem Kälberserum (entspricht 10 %) sowie 5 ml PenStrep (entspricht Penicillin 100 U/ml und Streptomycin  $100\mu\text{g/ml}$ ) benötigt.

### **3.2.4.3 Herstellung der Trypsinlösung**

Bei diesem Arbeitsschritt wurden 30 ml Phosphate Buffered Saline (PBS) mit 15 ml Trypsin vermischt.

### **3.2.4.4 Passagieren der Zellen**

Zuerst wurde das auf der Zellkulturplatte verbliebene Medium mittels einer Glasküvette abgesaugt. Für die Zellpassage wurden die konfluent gewachsenen Zellen einmalig mit 10 ml PBS gewaschen. Danach wurde wiederum abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml der hergestellten Trypsinlösung versetzt, leicht geschwenkt und für 5 Minuten im Zellkulturschrank inkubiert.

Das Lösen der Zellen von der Zellkulturschale erfolgte einerseits durch leichtes Klopfen und andererseits durch Zugabe von 5 ml Kulturmedium. Nachdem durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren die Zellen komplett gelöst worden waren, wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Sarstedtröhrchen überführt. Zur vollständigen Entfernung der Trypsinlösung wurden die Zellen bei Raumtemperatur drei Minuten schonend mit 310 x g zentrifugiert.

Der so entstandene Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das im Sarstedtröhrchen verbliebene Zellpellet wurde mit 10 ml Kulturmedium gründlich resuspendiert und vereinzelt. Von der so entstandenen Zellsuspension wurde 1 ml mit 10 ml Kulturmedium in einer neuen Zellkulturschale (ca. 10 cm) versetzt. So wurden die Zellen in einer 1:10 Verdünnung ausgesät.

Die Zellpassage erfolgte alle 7 Tage und in Vorbereitung auf die Operation zur Tumorzellinjektion. Die Zellen der Zellkultur wurden regelmäßig auf Mykoplasmen untersucht und waren regelmäßig negativ.

## **3.2.5 Methode *in vivo***

### **3.2.5.1 Zellinjektion in den Pankreaskopf**

In diesem Arbeitsschritt wurden die Zellen der murinen Zelllinie 6606-PDA in den Pankreaskopf des Versuchstieres injiziert, um so ein murines orthotopes Pankreaskarzinom entstehen zu lassen.

### 3.2.5.1.1 Vorbereitung der Zellen/Zellzählung

Die Vorbereitung der Zellen erfolgte bis zur Herstellung der Zellsuspension identisch wie unter *Punkt 3.2.4.4* beschrieben.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe einer Neubauer Zählkammer. Die Zellen wurden gewaschen, von der Zellkulturschale abgelöst, zentrifugiert und in DMEM Nährmedium resuspendiert. Zur Unterscheidung der vitalen von avitalen Zellen wurden die Zellen, entsprechend der Herstellerangaben, mit Trypanblau versetzt und ausgezählt. Während vitale Zellen in der Lage waren den Farbstoff auszuschließen und im mikroskopischen Bild hell erschienen, nahmen tote Zellen Trypanblau auf und waren tiefblau gefärbt.

Es wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung versetzt. Danach wurde das Gemisch etwa fünf Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und zum Füllen einer Neubauer Zählkammer verwendet. Grundsätzlich wurden mindestens vier Großquadrate ausgezählt.

Die Zelldichte berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = (\text{Zellzahl/Zahl der Großquadrate}) \times 2 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$$

Anschließend konnte, durch Aufkonzentrierung oder Verdünnung mit serumhaltigem Kulturmedium, die gewünschte spezifische Zellkonzentration der Suspension erreicht werden. Für die Tumorinduktion wurde eine Konzentration von 2 Millionen Zellen pro 1 ml benötigt. Diese Zielkonzentration wurde davor im Rahmen der Etablierung des Tumormodells für die Induktion des Pankreaskarzinoms bei mehreren Arbeiten genutzt. Es zeigte sich stets ein Anteil vitaler Zellen von mehr als 95 %.

### 3.2.5.1.2 Anästhesie

Zur Narkotisierung der Versuchstiere wurde eine Injektionslösung aus 0,5 ml Rompun (2 %), 4 ml Ketanest (25 mg/ml) und 5,5 ml Natriumchloridlösung (0,9 %) frisch hergestellt und 10 µl/g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Ungefähr 5 Minuten nach der Injektion wurde die Narkosetiefe durch Setzen eines Schmerzreizes an den Vorderpfoten überprüft und bei weiterhin bestehender Schmerzempfindlichkeit durch eine Gabe von 0,1 ml vertieft.

### **3.2.5.1.3 Vorbereitung der Operation**

Das Versuchstier wurde entsprechend seinem Gewicht intraperitoneal narkotisiert. In der Zwischenzeit wurden die vorbereiteten Zellen drei Minuten lang bei 1000 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit 80 µl PBS und 80 µl des auf Eis gelagerten Matrigels versetzt und vorsichtig, sodass sich kein Schaum bildete, resuspendiert. Die 2 Millionen Zellen waren nun in 160 µl Zell-Matrigel-Suspension aufgelöst. In einem nächsten Schritt wurden 20 µl des Gemisches auf eine Hamiltonspritze aufgezogen und sowohl die Hamiltonspritze als auch die verbliebene Restsuspension auf Eis gelagert. In der Hamiltonspritze befanden sich nun 250.000 Zellen, die in den Pankreaskopf des Versuchstieres injiziert werden konnten.

### **3.2.5.1.4 Durchführung der Operation**

Im narkotisierten Zustand wurde das Versuchstier rücklings für die Operation auf einer Styroporplatte an den Vorder- und Hinterläufen fixiert. Das Bauchfell wurde mit 70%igem Ethanol desinfiziert und mit einem Tupfer glatt gestrichen, um zu vermeiden, dass Haare in die Bauchhöhle gelangten. Die desinfizierte Bauchhaut wurde mit einer Pinzette leicht angehoben, um die folgende Inzision der Haut zu erleichtern. Die Haut und analog die darunter liegende Muskelfaszie wurden am Abdomen des Versuchstieres im rechten Oberbauch transversal unter Vermeidung von Blutungen mit einem 1 cm langen Schnitt inzidiert.

Mittels eines Wattestäbchens wurde das Duodenum bzw. das duodenale „C“ aufgesucht, nach extrakorporal verlagert und anschließend fixiert. Es erfolgte die Injektion von 20 µl der auf Eis gelagerten Zell-Matrigel-Suspension in den Pankreaskopf. Nach der Injektion wurde die eventuell verbliebene freie Suspension um die Injektionsstelle mit einem Wattetupfer entfernt, um somit eine Tumorentstehung an anderer Stelle zu vermeiden. Das Matrigel wurde dazu verwendet, die Tumorzellen im Pankreaskopf zu fixieren. Es ist bei niedrigen Temperaturen flüssig, härtet jedoch bei höheren Temperaturen, wie z. B. der Körpertemperatur des Versuchstieres, schnell aus. Somit wurde gewährleistet, dass die Tumorzellen im Pankreaskopf verblieben und nicht an der Punktionsstelle am Pankreaskopf austraten und hier oder an anderer Stelle der Peritonealhöhle einen Tumor induzierten.



In einem weiteren Schritt wurden das duodenale „C“ und das Pankreas reponiert und ca. 0,5 ml 0,9%iger Natriumchloridlösung in die Bauchhöhle injiziert, um den Flüssigkeitsverlust während der Operation auszugleichen. Die Wunde wurde fortlaufend mit einem 4/0 Polyesterfaden vernäht, sodass sowohl Peritoneum als auch Muskulatur und Haut gut verschlossen waren.

#### **3.2.5.1.5 Schmerztherapie**

Alle Versuchstiere erhielten postoperativ eine einmalige Schmerztherapie mit Buprenorphin 0,1 mg/kg Körpergewicht i.m. und wurden zur Stabilisierung der Körpertemperatur postoperativ auf einem mit 37°C warmen Wasser gefüllten Latexhandschuh gelagert. Die postoperative Überwachung der Versuchstiere wurde dokumentiert.

#### **3.2.5.2 Das Stressmodell**

Die Versuchstiere wurden nach der Tumorimplantation in folgende vier Gruppen randomisiert:

- 1. Gruppe: Versuchs-/Stressgruppe mit 4 Wochen Stress
- 2. Gruppe: Kontrollgruppe 4 Wochen
- 3. Gruppe: Versuchs-/Stressgruppe mit 6 Wochen Stress
- 4. Gruppe: Kontrollgruppe 6 Wochen.

Die Stress- und die Kontrollgruppen wurden voneinander getrennt in zwei separaten Räumen gehalten.

Die Kontrollgruppen wurden keinem Stress ausgesetzt und wurden durch die gesonderte Haltung nicht vom Stressmodell beeinflusst. Die Versuchstiere der Kontrollgruppen wurden vier oder sechs Wochen in den Käfigen gehalten und anschließend *in vivo* mikroskopiert.

Die Stressgruppen jedoch wurden zweimal täglich (morgens und abends) für jeweils zwei Stunden akustischem und räumlichem Engstress ausgesetzt. Dabei wurde eine Vorgehensweise verwendet, die auch schon in anderen Versuchsreihen erfolgreich durchgeführt wurde:

Hierbei wurden die Versuchstiere wiederholter, intermittierender akustischer Belastung und Bewegungseinschränkung ausgesetzt. Dazu wurden die

Versuchstiere in 50 ml große Zentrifugenröhrchen gesetzt. Die Spitzen der Röhrchen wurden für eine ausreichende Belüftung mehrmals perforiert und für den Schwanz wurde der Deckel mit einem entsprechend standardisierten Loch versehen. In diesen Röhrchen konnten sich die Versuchstiere in einem begrenzten Umfang vor- und zurückbewegen. Allerdings war ein Umdrehen nicht möglich. Die Röhrchen mit den Versuchstieren wurden horizontal in ein selbstgebautes Styroporgestell gesetzt. Eine Schallquelle, die ca. 30 cm von dem Gestell entfernt aufgestellt wurde, erzeugte intermittierend randomisierte Schallwellen mit Frequenzen von 15 – 25 Hz und Schalldruckpegeln zwischen 50 – 85 dB. Nach den einzelnen Stresssitzungen wurden die Versuchstiere wieder frei gelassen, in die Käfige zurückverbracht und die Schallquelle wurde ausgeschaltet.

Nachdem die Versuchstiere auf diese Weise vier oder sechs Wochen gestresst wurden, konnten sie danach ebenfalls *in vivo* mikroskopiert werden.

### **3.2.5.3 Bestimmung des Tumervolumens der beiden 4 Wochengruppen**

#### **3.2.5.3.1 Durchführung der MRT Untersuchung**

Die Versuchstiere der Gruppen eins und zwei (Stress- und Kontrollgruppe) wurden vier Wochen nach der Tumorzellinjektion und vor der intravitalmikroskopischen Untersuchung mittels Kleintier-MRT untersucht, um die Größe der Tumoren mittels MRT volumetrieren zu können.

Um während der MRT-Untersuchung die störende Darmmotilität zu reduzieren, wurden die Versuchstiere vier Stunden vor der Untersuchung nüchtern belassen. Zum Transport der Tiere innerhalb des Biotechnikums vom Tierstall in das MRT wurden spezielle Transportboxen verwendet. Für die Vorbereitung der etwa 25- bis 30-minütigen Untersuchung im Kleintier-MRT wurden die Tiere mit 1 % - 1,5 % Isofluran über ein spezielles Veterinärnarkosesystem narkotisiert sowie gleichzeitig mit hochkonzentriertem Sauerstoff versorgt. Sobald die Tiere ausreichend tief narkotisiert waren, wurden sie in Bauchlage auf dem MRT-Schlitten platziert und die Augen durch einen Tropfen Bepanthen®-Augen- und Nasensalbe vor dem Austrocknen geschützt. Durch den Einsatz eines Atempads wurde die Atmung der Tiere sowohl während der Vorbereitung als auch bei der eigentlichen MRT-Untersuchung permanent überwacht und die Narkosetiefe mit Hilfe der Atemfrequenz gesteuert. Zur Minimierung von Bewegungsartefakten wurde eine Atemfrequenz von

30 bis 40/min vorgegeben und es erfolgte eine respirationsausgelöste Sequenzakquise.

Die Untersuchung selbst wurde in einem 7 Tesla MRT für Kleintiere durchgeführt. Die Bildgebung erfolgte in einer Ganzkörper-Maus-Spule, einer Volumen-Spule, die die Bildgebung einer ganzen Maus ohne die Erzeugung von Inhomogenitäten erlaubte.

Nach 2 Lokalisationssequenzen, die der Orientierung im Versuchstier und der Lokalisation in X, Y und Z Ebene dienten, wurde ein FoV (Field of View) definiert, welches den kranialen Teil der unteren Extremität, das komplette Abdomen und den kaudalen Teil beider Lungenflügel umfasste. Zur Messung wurde zunächst eine hochauflösende, T2-gewichtete, koronare Sequenz [(TR (repetition time): 1200 ms; TE (echo time): 41,0 ms; FA (flip angle): 180°; FoV (field of view): 42 mm × 42 mm; FoV Phase: 100 %; Matrix: 240 × 320; 12 Schichten mit 0,7 mm Schichtdicke; Akquisitionszeit: ca. 15 min)] durchgeführt. Dann erfolgte eine weitere T2-gewichtete Sequenz in transversaler Ebene [(TR (repetition time): 1250 ms; TE (echo time): 41 ms; FA (flip angle): 180°; FoV (Field of view): 40 mm × 40 mm; FoV Phase: 100 %; Matrix: 240 × 320; 35 Schichten mit 0,7 mm Schichtdicke; Akquisitionszeit: ca. 10min)].

Nach Beendigung der Untersuchung wurden die Versuchstiere zunächst zur schnelleren Erholung unter eine Rotlichtlampe in einen Einzelkäfig gelegt. Sobald sie wieder liefen, wurden sie zu den anderen Versuchstieren in ihren ursprünglichen Käfig zurückverbracht.

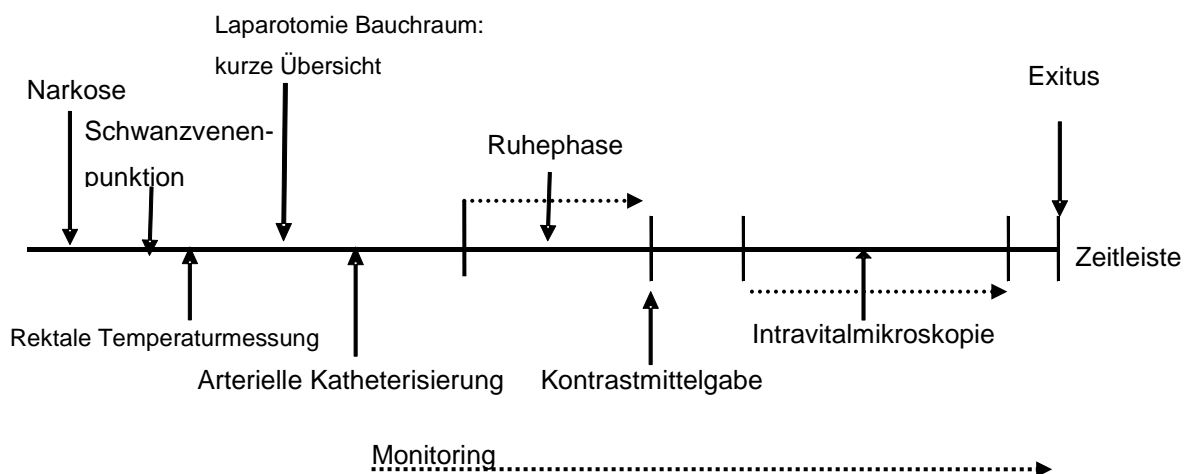
#### **3.2.5.3.2 Bestimmung des Tumorumfanges**

Die so entstandenen Daten wurden mit dem Programm MIPAV (medical imaging processing and visualisation) bearbeitet und einfach verblindet zu einem späteren Zeitpunkt ausgewertet. Der Tumor wurde zwecks Volumetrie mittels sogenannter Interessenregionen („Region of Interest“ (ROI)) in jeder transversalen MRT-Schicht markiert (siehe Abbildungen 21 - 24). Das Programm konnte mit einem speziellen Algorithmus, der die markierten Größen der ROIs sowie die Dicke der Tumorschnitte berücksichtigte, das Volumen des Tumors bestimmen [alle markierten ROIs ergaben durch Interpolation der Flächen (mittels Software, basierend auf einer kubischen Parabelfunktion mit geeigneten Koeffizienten ( $ax^3 + bx^2 + cx + d$ )), das gesuchte Volumen].

Satellitentumoren wurden als Teil des Tumors angesehen, wenn sie eine kontinuierliche Verbindung zum Primärtumor besaßen. Metastasen und sekundäre Tumoren wurden von der Messung ausgeschlossen. Die Tumorgrenzen bzw. die Ausdehnung des Tumors konnte auf den Bildern auch ohne Kontrastmittel identifiziert werden, da der Tumor eine charakteristische Form sowie eine eindeutige Erscheinung hatte. Zeigten sich jedoch während der Auswertung schwierige Sachverhalte oder schwer zu beurteilende Bilder, so wurden diese Befunde mit weiteren Radiologen besprochen. Das gemessene Volumen des Tumors wurde in mm<sup>3</sup> angegeben.

#### 3.2.5.4 Der intravitalmikroskopische Untersuchungsablauf

Der Ablauf der Intravitalmikroskopie war für alle Gruppen identisch. Der vollständige intravitalmikroskopische Untersuchungsablauf teilte sich in mehrere Schritte (Abb. 5).



**Abb. 5: Schematisches Ablaufdiagramm zur Vorbereitung und Durchführung der IVM**

Nach der Narkosegabe erhielt das Versuchstier zunächst einen venösen Zugang in eine Schwanzvene. Anschließend wurde eine rektale Sonde zur Temperaturmessung gelegt.

Als nächstes wurde der Bauchraum eröffnet, um das Pankreaskarzinom darstellen zu können. Bei diesem sehr kurzgehaltenen Schritt, der lediglich der Übersicht diente, wurde gleichzeitig darauf geachtet, dass der Tumor ein orthotopes Wachstum aufwies und nicht als Narbentumor gewachsen war. Wenn sich bei einem

Versuchstier ein solcher Narbentumor darstellte und kein Pankreastumor erkennbar war, wurde dieses Versuchstier aus der Versuchsreihe ausgeschlossen.

Nach der Präparation des Bauchraumes wurde dieser zunächst vorläufig wieder geschlossen und eine weitere Präparation, die das Legen des arteriellen Katheters in die Arteria carotis communis (A.c.c.) beinhaltete, durchgeführt. Der Katheter wurde für das Monitoring der Vitalparameter während der Intravitalmikroskopie benötigt.

Nach der ersten Messung der Vitalparameter und einer kurzen Ruhephase wurden dem Versuchstier 15 Minuten vor Beginn des Mikroskopierens über den venösen Zugang an der Schwanzvene 1ml/kg-Körpergewicht bovines FITC-Dextran 5 % als Kontrastmittel intravenös verabreicht. Der Bauchraum wurde nun komplett eröffnet. Die Mikroskopierphase dauerte maximal 45 Minuten. Nach Abschluss der Untersuchung wurde das Versuchstier getötet.

#### **3.2.5.4.1 Narkose**

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit einer Injektionslösung aus 0,5 ml Rompun (2 %), 4 ml Ketanest (25 mg/ml) und 5,5 ml Natriumchloridlösung (0,9 %) frisch hergestellt und in einer Dosis von 10 µl/g Körpergewicht, die intraperitoneal injiziert wurde. Ungefähr fünf Minuten nach der Injektion wurde die Narkosetiefe durch Setzen eines Schmerzreizes an den Vorderpfoten überprüft und, bei weiterhin bestehender Schmerzempfindlichkeit, durch die Gabe von 0,1 ml nochmals vertieft. Etwa 5 bis 10 Minuten nach Narkosebeginn war die gewünschte Narkosetiefe erreicht, und es konnte mit der Präparation begonnen werden. Die Narkoseaufrechterhaltung konnte bei unzureichender Narkosetiefe erneut intraperitoneal in einer Dosis von 4 µl/g Körpergewicht fortgeführt werden. Die Narkosetiefe wurde regelmäßig durch das Setzen eines Schmerzreizes an den Hinterpfoten und anhand der Vitalparameterüberwachung orientierend geprüft. Wenn der Schmerzreiz auslösbar war und die Atemfrequenz sowie die Herzfrequenz anstiegen, war die Narkosetiefe nicht ausreichend. Dann erfolgte eine erneute Gabe des Narkosemittels.

Zur Sicherung der Atemwege des Versuchstieres wurde um die vorderen Nagezähne eine Schlaufe gelegt und mit Hilfe dieser Schlaufe der Kopf so rekliniert, dass das Versuchstier sicher spontan die Raumluft atmen konnte.

#### **3.2.5.4.2 Vorbereitende Präparationen**

Das narkotisierte Versuchstier wurde in Rückenlage auf einer abnehmbaren Platte des Intravitalmikroskopie-Untersuchungstisches fixiert. Diese Platte wurde auf einer speziellen Heizplatte gelagert, um das Versuchstier vor einer Auskühlung zu schützen.

Im ersten Schritt wurde eine der Schwanzvenen des Versuchstieres mit einer Venenverweilkanüle 26G punktiert und danach entsprechend fixiert. Über diese Form des Zugangs konnte im späteren Verlauf des Versuches das Kontrastmittel appliziert werden. Es durften bei der Kontrastmittelgabe keine Luftblasen mit appliziert werden, um eine Luftembolie, die schon bei geringsten Luftvolumina auftreten konnte, zu verhindern. Hierzu wurde mit einer 2 ml großen Einmalspritze, die mit isotoner 0,9%iger Natriumchloridlösung gefüllt war, mittels einer 26 G Einmalkanüle die Öffnung der Venenverweilkanüle mit Flüssigkeit gefüllt, sodass beim Aufsetzen der mit Kontrastmittel gefüllten Spritze keine Luftblasen in das Versuchstier appliziert wurden. Nach der Punktion der Schwanzvene wurde eine rektale Temperatursonde zur Messung der Körpertemperatur gelegt.

Im zweiten Schritt wurde das Versuchstier laparotomiert. Hierbei wurde das Bauchfell mit 70%igem Ethanol desinfiziert und mit einem Tupfer glatt gestrichen, um zu vermeiden, dass Haare in die Bauchhöhle gelangten. Die desinfizierte Bauchhaut wurde mit einer Pinzette leicht angehoben, um die folgende Inzision der Haut zu erleichtern. Die Haut und analog die darunter liegende Muskelfaszie wurden am Abdomen des Versuchstieres im rechten Oberbauch transversal unter Vermeidung von Blutungen mit einem 1 cm langen Schnitt inzidiert. Mittels zweier Wattestäbchen wurde das Pankreas mit Karzinom aufgesucht, der Bauchraum kurz exploriert und anschließend wieder mit einem Polyesterfaden 4/0 an zwei Stellen leicht vernäht. Der Schnitt wurde zusätzlich steril abgedeckt und vor Austrocknung geschützt. Die explorative Laparotomie des Bauchraumes wurde durchgeführt, um eventuelle Ausschlusskriterien, wie z. B. einen Narbentumor, einen Tumor an anderer Stelle oder keinen vorhandenen Pankreastumor, schon zu Beginn des Versuches zu erkennen und das Versuchstier somit zeitig aus der Versuchsreihe ausschließen zu können.

Im dritten Schritt erfolgte die Operation am Hals des Versuchstieres. Hierzu wurde das Fell des schon zuvor reklinierten Halses des Versuchstieres mit 70%igem Ethanol desinfiziert und mit einem Tupfer glatt gestrichen, um zu vermeiden, dass

Haare in das Operationsgebiet gelangten. Über eine etwa 1 cm lange kranio-kaudale Schnittführung am medialen Halsbereich erfolgte die Freilegung der Muskulatur und der Halsfaszien. Nun konnte unter Zuhilfenahme eines Mikroskops die größtenteils stumpfe Präparation erfolgen, um die Arteria carotis communis auffinden und anschließend darstellen zu können. Die Arteria carotis communis wiederum wurde stumpf freipräpariert und unter größter Vorsicht vom Nervus vagus getrennt, um bei der weiteren Präparation einen vagalen Reiz mit daraus resultierender Atemdepression zu vermeiden. Im nächsten Schritt wurde die Arterie distal weit nach kranial ligiert und proximal zum Herzen mit einer Mikrogefäßklemme abgeklemmt. In das nun prallgefüllte und gut darstellbare Gefäß wurde ein Katheter (Polyethylenkatheter [0,28 mm Innendurchmesser/ 0,61 mm Außendurchmesser]) unter Zuhilfenahme eines selbst gefertigten Gefäßerweiterers mittels Venae-section-Technik in die Arterie eingelegt und mittels eines Polyestergeräts am Gefäß fixiert. Die ausreichende Fixation erfolgte mit chirurgischem Nahtmaterial an der Haut des Versuchstieres. Der Anschluss des Portexschlauches erfolgte mittels eines baugleichen Perfusors über ein invasives Blutdruckmesssystem (Drucktransducer) an das Intensivmonitorsystem. Das Operationsgebiet wurde nach Beendigung der Präparation steril abgedeckt und vor Austrocknung geschützt.

#### **3.2.5.4.3 Monitoring**

Somit konnte nach Abschluss der ca. 30-minütigen Präparationen über diesen in der Arteria carotis communis liegenden Katheter ein kontinuierliches Monitoring des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP) sowie der Herzfrequenz erfolgen. Die Temperatur des Versuchstieres konnte über eine im Rektum liegende Temperatursonde ebenfalls kontinuierlich über das Intensivmonitorsystem von Hewlett Packard überwacht werden.

#### **3.2.5.4.4 Additive Technik zur Durchführung der Intravitalmikroskopie**

Zur Durchführung der IVM wurden die folgenden zusätzlichen Geräte benötigt:

- Epifluoreszenzmikroskop/Auflichtmikroskop (Axiotech vario 100 HD, Carl Zeiss, Jena)
- Lichtquelle (HBO 50, Carl Zeiss, Jena)
- Objektiv (Achromat 20x / 0,5, Carl Zeiss, Jena)

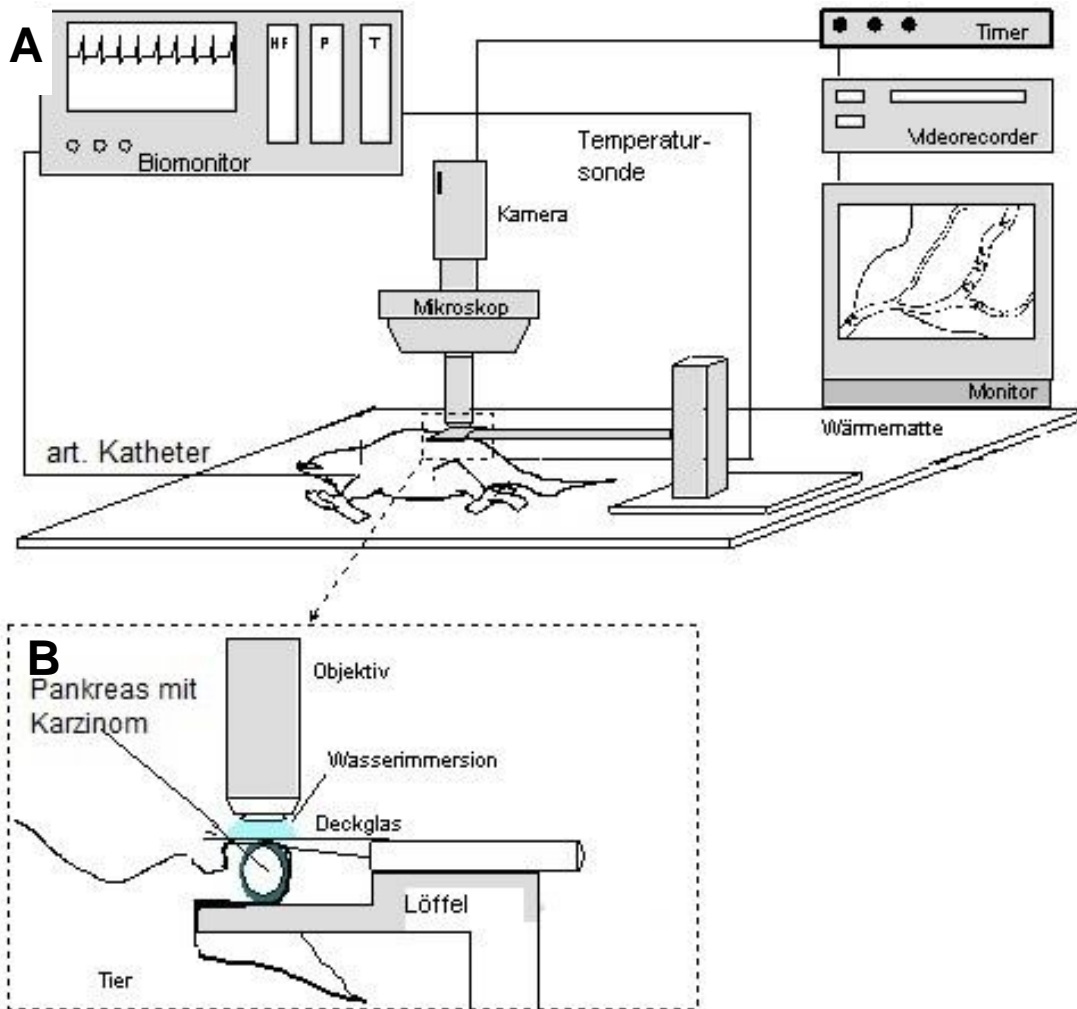
- Filtersatz Nr. 10, Carl Zeiss (Anregung: BP 450 - 490nm; Frequenzteiler: 510; Emission: BP 515 - 565nm) für Beobachtungen mit FITC-Albumin
- 6GS/W-CCD-Kamera, hochauflösend bei fluoreszierendem Licht (AVT-BC 12, AVT Horn, Aalen)
- Videorecorder (NV-SV120, Panasonic, Matsushita, Tokio, Japan)
- Monitor (PM 159, Ikegami, Maywood, USA)
- Fluid Warming System (Hotline HL-90, Smith Medical, London, UK)

Durch diese Konfiguration war eine 270-fache Vergrößerung des zu untersuchenden Gebietes möglich.

#### **3.2.5.4.5 Durchführung der Intravitalmikroskopie**

Nachdem die unter Punkt 3.2.5.4.2 beschriebenen Präparationen durchgeführt waren, erfolgte im nächsten Schritt die Umlagerung der Platte, auf der das Versuchstier bereits fixiert wurde, mit der Heizplatte auf den Untersuchungstisch für die Intravitalmikroskopie. Der Versuchsaufbau für den Ablauf der Intravitalmikroskopie wird in der Abbildung 6 schematisch dargestellt.





**Abb. 6: Schematischer Versuchsaufbau bei der IVM**

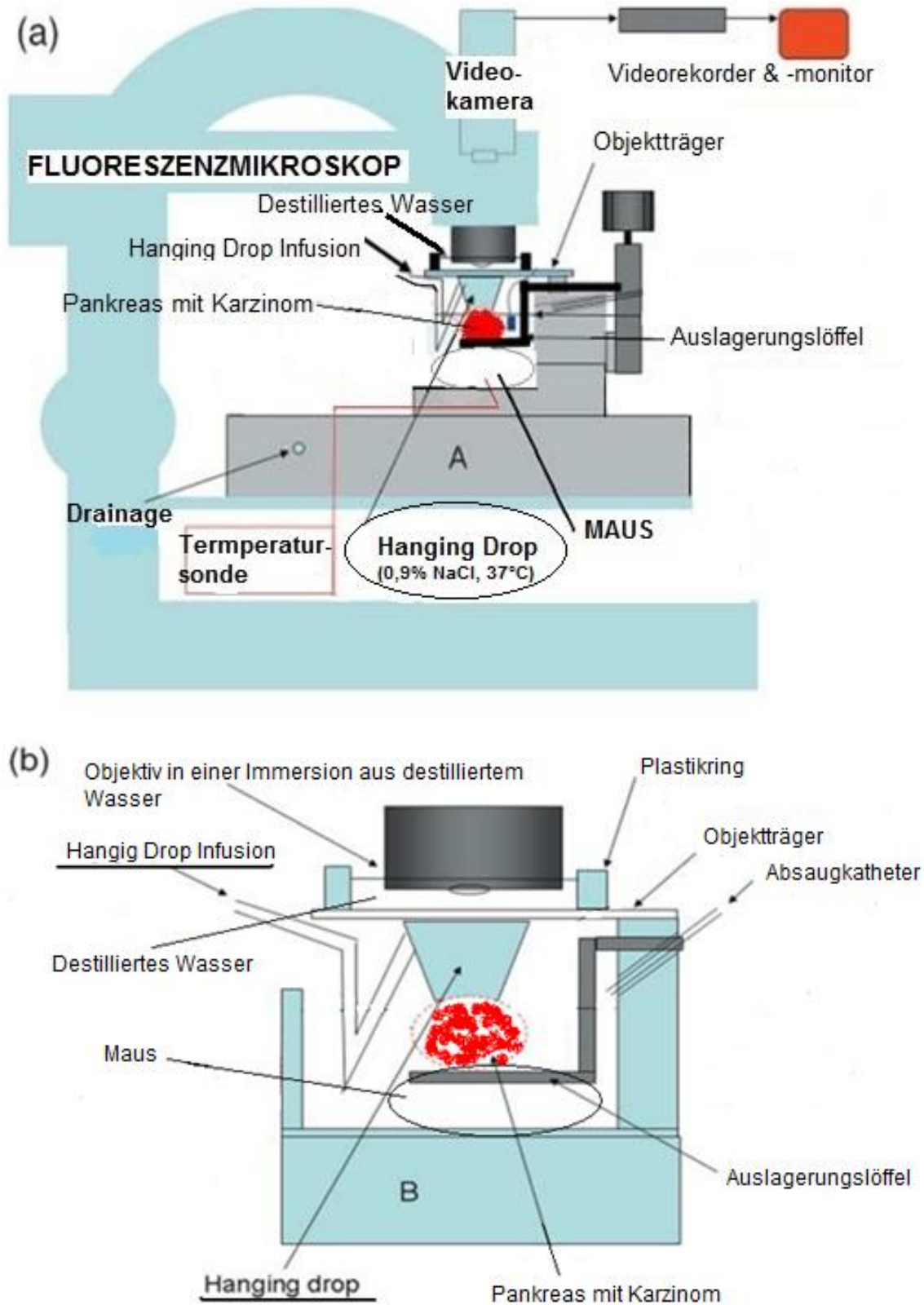
**A)** Das Versuchstier liegt unter dem Mikroskop auf einer Wärmematte. Die Vitalparameter können über den arteriellen Katheter und die Temperatursonde auf dem Biomonitor überwacht werden. Das Mikroskop ist nicht nur an einen Monitor, sondern auch an einen Videorecorder angeschlossen.

**B)** Vergrößerung des schraffierten Bereichs aus A. Das ausgelagerte Pankreas mit Karzinom befindet sich auf dem Löffel. Das Deckglas bildet den Abschluss nach oben. Zwischen Deckglas und Objektiv befindet sich die Wasserimmersion (aus [152, 153]: modifiziert nach Bruns).

Der Bauchraum des Versuchstieres wurde erneut eröffnet. Hierzu wurden die zwei zuvor gesetzten Nähte aufgetrennt und das Pankreas mit Karzinom mittels zweier Wattestäbchen nach extrakorporal verlagert. Das Pankreas konnte nun auf einer dafür vorgesehenen Haltevorrichtung des Tisches abgelegt werden. Diese Haltevorrichtung in Form eines Löffels diente einerseits dazu, das Pankreas nach extrakorporal zu verlagern und andererseits zur relativen Ruhigstellung des Mikroskopiergebietes. Das Pankreas konnte so bei Rückenlage des Versuchstieres atraumatisch aus der Bauchhöhle ausgelagert und spannungsfrei auf die von außen

in Höhe und Seite verstellbare Haltevorrichtung verbracht werden. Hierbei wurde sehr viel Wert auf eine kontaktarme und minimalinvasive Auslagerung mit Hilfe von Wattestäbchen gelegt. Es wurden Voruntersuchungen am Mikroskop ohne diese Halterung durchgeführt. Hierbei stellten sich die mikroskopierte Bereiche, bei nicht extrakorporaler Lagerung des Pankreas, durch die Atmung des Versuchstiers unscharf und nicht auswertbar dar.

Oberhalb des ausgelagerten Pankreas befand sich ein Objektträger, der an einer anderen flexiblen Halterung befestigt wurde. Das destillierte Wasser zwischen Objektiv und Objektträger diente als Immersionsflüssigkeit, sodass das Karzinom im Pankreas mikroskopiert werden konnte (Abb. 7a & 7b). Das entsprechende Pankreaskarzinomstück wurde kontinuierlich mit einer 0,9%igen Natriumchloridlösung, die durch einen Infusionswärmer *Hotline* auf 37°C gebracht wurde, betropft (Flussrate etwa 1 ml/min). Dadurch entstand zwischen der Unterseite des Objektträgers und der Oberfläche des Pankreaskarzinoms ein sogenannter „hängender Tropfen“ (engl. „hanging drop“) [152]. Dieser „hängende Tropfen“ verhinderte, dass das in unmittelbarer Nähe zur Objektträgerunterseite befindliche Stück Pankreaskarzinom durch Anstoßen an die Glasfläche irritiert werden konnte (Abb. 7a & 7b).



**Abb. 7a) und 7b): Darstellung des Arbeitsplatzes am Intravitalmikroskop nach dem Prinzip des hängenden Tropfens („Hanging Drop“):**

(a) Schema des Arbeitsplatzes in 2D-Darstellung; (b) Prinzip des „Hanging Drop“ im Detail (aus [152]: modifiziert nach Bruns).

Das Pankreaskarzinom wurde nun *in vivo* mit einer Mikroskopieroptik 20 x / 0,5 untersucht. Das fluoreszierende Licht wurde mit einer hochauflösenden Videokamera registriert, auf einen Monitor übertragen und mit einem Rekorder digital gespeichert. Fünfzehn Minuten vor Beginn der Mikroskopie erfolgte die "*in-vivo*-Markierung" des Plasmas zur notwendigen Kontrastanhebung der Gefäße mit 1ml/kg-Körpergewicht bovinem FITC-Dextran (5 %). Durch die Kontrastanhebung des Plasmas mit FITC-Dextran und einem speziellen Filter war eine Untersuchung der Mikrogefäße möglich. Hierzu wurden nach Fokussierung und dem Aufsuchen unterschiedlicher Bereiche mit Mikrogefäßen insgesamt bis zu sieben Gesichtsfelder mit jeweils 35 Sekunden Dauer mit Hilfe des Videorekorders aufgezeichnet. Es wurden nur jeweils sieben verschiedene Aufnahmefelder in Sequenzen von 35 Sekunden aufgenommen, um die durch Steinbauer et al. beschriebene phototoxische Schädigung minimal zu halten [154]. Nach der Durchführung der Intravitalmikroskopie erfolgte die Tötung des noch narkotisierten Tieres.

### **3.2.5.5 Bestimmung des Tumorummens der beiden 6 Wochengruppen**

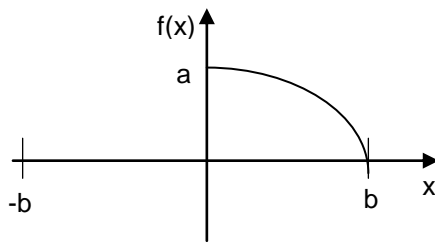
#### **3.2.5.5.1 Vorgehensweise bei der Ausmessung des Tumors**

Die Tumoren der Versuchstiere des sechswöchigen Turnus wurden am Ende der Intravitalmikroskopie aus dem toten Versuchstier heraus präpariert. Danach erfolgte die Messung der Tumormaße mit Hilfe einer elektronischen Schieblehre. Es wurden bis zu drei Ausdehnungsrichtungen bestimmt. Die Tumoren hatten makroskopisch meist annähernd die Form eines Ellipsoides.

#### **3.2.5.5.2 Bestimmung des Tumorummens**

Das Volumen der Tumoren wurde näherungsweise berechnet. Aufgrund der drei gemessenen Ausdehnungsrichtungen hätte zur Berechnung des Volumens auch ein Quader angenommen werden können. Diese Annäherung an das tatsächliche Volumen wäre jedoch zu grob gewesen, sodass statt der unregelmäßigen Form des Tumors zunächst für den Schnitt die Form einer Ellipse angenommen wurde.

Die Abbildung 8 zeigt zum einen die Funktion zur Berechnung einer Ellipse und zum anderen die daraus resultierende Formel zur Berechnung einer Ellipse.



Formel:  $\frac{x^2}{a^2} + \frac{f(x)^2}{b^2} = 1$

**Abb. 8: Funktion zur Berechnung einer Ellipse und daraus resultierende Formel**

Die Parameter a und b entsprechen dabei den halben Ausdehnungsrichtungen der Ellipse. Zur Vereinfachung der Berechnung und zur besseren Vergleichbarkeit der Tumervolumina untereinander wurden bei jedem Tumor die zwei längsten Ausdehnungsrichtungen für die Parameter a und b berechnet und in die Formel eingesetzt.

Die so erhaltene Ellipse wurde jetzt um ihre längste Hauptachse (hier die x-Achse) gedreht. Man erhält ein Rotationsellipsoid. Zur Berechnung des Volumens solcher Rotationskörper gilt:

$$V = \pi \int_a^b (f(x))^2 dx$$

Bei der Berechnung des Tumervolumens wurden die Integralgrenzen entsprechend o. g. Betrachtungen verändert, sodass gilt:

$$V = \pi \int_{-b}^b (f(x))^2 dx$$

Das Volumen des so erhaltenen Rotationsellipsoids sollte dann näherungsweise dem Tumervolumen in den 6 Wochen Stress- und Kontrollgruppen entsprechen. Die Tumervolumina wurden in mm<sup>3</sup> angegeben.

### 3.2.6 Auswertung der Daten der Intravitalmikroskopie

Die Auswertung der einzelnen Videosequenzen erfolgte verblindet zu einem späteren Zeitpunkt und nicht im direkten Anschluss an die Intravitalmikroskopie, um so eine mögliche Beeinflussung der Auswertung zu vermeiden. Für die Auswertung wurde ein spezielles Computerprogramm namens CaplImage verwendet. Bevor mit der aktiven Auswertung begonnen werden konnte, musste im Programm selbst die

Vergrößerung festgelegt werden. Hierbei wurde die Aufnahme eines mm-Maßes am Bildschirm nachgemessen und das Ergebnis zum entsprechenden Abgleich gespeichert.

#### **3.2.6.1 Mikrogefäßdichte (microvessel density, MVD)**

Durch die Plasmakontrastierung mit FITC-Dextran (Plasma: Hell, Erythrozyten: Dunkel) wurde die Erythrozytenperfusion in dem jeweiligen Gefäß sichtbar gemacht. Die MVD wurde aus der Länge der kontrastierten und damit gut sichtbar perfundierten Mikrogefäße im Verhältnis zu einer umschriebenen Fläche errechnet [104, 155].

Mit Hilfe des Programmes CapImage wurde die MVD in den aufgenommenen Gesichtsfeldern je Versuchstier bestimmt. Dazu wurde innerhalb des Programmes eine durch das Programm geeichte Fläche benutzt, in der die Mikrogefäße ihrer Länge nach nachgezeichnet wurden. Die Berechnung der MVD erfolgte automatisch durch das Programm und wurde mit der Einheit ( $\text{cm}^{-1}$ ) angegeben.

Von den jeweils sieben aufgenommenen Gesichtsfeldern pro Versuchstier wurde dann der arithmetische Mittelwert pro Versuchstier bestimmt.

#### **3.2.6.2 Vitalparameter**

Die Vitalparameter, wie die Körpertemperatur, die Herzfrequenz und der mittlere arterielle Druck, wurden während der Intravitalmikroskopie in einem Abstand von etwa 10-15 Minuten gemessen und auf dem Versuchsprotokoll dokumentiert.

### **3.3 Statistische Auswertung**

Die statistische Analyse der Ergebnisse und die graphische Darstellung erfolgten mit dem Programm GraphPadPrism 5.01 für Windows.

Aufgrund des kleinen Stichprobenumfanges und der Möglichkeit, dass eine Normalverteilung der Daten nicht gewährleistet werden kann, erfolgte die Auswertung der Daten mittels Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz. Dieser nichtparametrische Rangsummentest wird zur Datenauswertung von zwei unabhängigen, intervallskalierten Stichproben genutzt, die nicht normalverteilt sind. Der Vorteil dieses Tests besteht darin, dass er Unterschiede der zentralen Tendenz darstellen kann.

Die Ergebnisse werden als arithmetischer Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) dargestellt, wobei  $p < 0,05$  als signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen gewertet und in den Graphen mit \* verdeutlicht wird.

### **3.4 Ausschluss von Versuchstieren**

Wie unter Punkt 3.2.3 beschrieben, wurden im Versuchsmodell vier Gruppen zu je sieben Versuchstieren festgelegt. Es wurden zunächst zwei Gruppen mit jeweils vier oder sechs Wochen Versuchsdauer gebildet. Innerhalb dieser zwei Gruppen wurden dann zwei weitere Untergruppen, die Stressgruppe und die Kontrollgruppe, bestimmt. Die Stressgruppen wurden jeweils vier oder sechs Wochen lang gestresst. Die Kontrollgruppen wurden ohne Stress in einem anderen Raum separat gehalten.

Es konnten jedoch zum Zeitpunkt der Intravitalmikroskopie nach vier bzw. sechs Wochen nicht alle 28 Versuchstiere untersucht bzw. mit in die Versuchsreihe eingeschlossen werden. Es kam zum Tod der Versuchstiere bei der Tumorimplantation (1x Kontrolle 4 Wochen), beim Vorgang des Stressens (1x Stress 6 Wochen), bei der Durchführung der Narkose für die IVM (1x Stress 4 Wochen), durch eine Luftembolie bei der Kontrastmittelgabe (1x Kontrolle 6 Wochen) und beim Legen des arteriellen Katheters (2: 1x Stress 4 Wochen und 1x Kontrolle 6 Wochen). Zusätzlich mussten weitere Versuchstiere beim Vorliegen eines Narbenkarzinoms und/oder eines Peritonealkarzinoms, ohne dass sich ein Pankreaskarzinom als Primärtumor zeigte oder sie mit diesem in Verbindung standen, aus der Versuchsreihe ausgeschlossen werden (2 : 1x Stress 6 Wochen und 1x Kontrolle 4 Wochen).

Somit konnten insgesamt 20 Versuchstiere in die Versuchsreihe eingeschlossen werden.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Von der Idee zur Durchführung - Die Etablierung einer neuen Methode**

Die Intravitalmikroskopie am murinen orthotopen syngenem Pankreaskarzinom wurde zum Zeitpunkt dieser Arbeit in keiner bekannten Arbeitsgruppe durchgeführt. Aus diesem Grund musste zunächst im Vorfeld der Versuchsreihe ein neuer Versuchsablauf und Versuchsaufbau zur Durchführung der Intravitalmikroskopie am murinen orthotopen syngenem Pankreaskarzinom entwickelt werden (siehe *Punkt* 3.2.3 und 3.2.5.4). Des Weiteren musste ein neuer Untersuchungstisch, an dem die Intravitalmikroskopie des Versuchstieres durchgeführt werden konnte, entwickelt werden.

#### **4.1.1 Der Intravitalmikroskopie-Untersuchungstisch**

Mit Unterstützung von Herrn PD Dr. D. Pavlovic aus der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universität Greifswald im Bereich Forschung konnten vorläufige Skizzen erstellt werden (Abb. 9 und 10). Nach Vorgesprächen mit den Feinmechanikern der Universität Greifswald wurden diese Skizzen dann mit den dazugehörigen Größenverhältnissen und Abmessungen an die Feinmechaniker übergeben. Diese stellten unter Berücksichtigung der Skizzen und Größenangaben den Untersuchungstisch, bestehend aus zwei Grundkomponenten, her (Abb. 11 und 12).



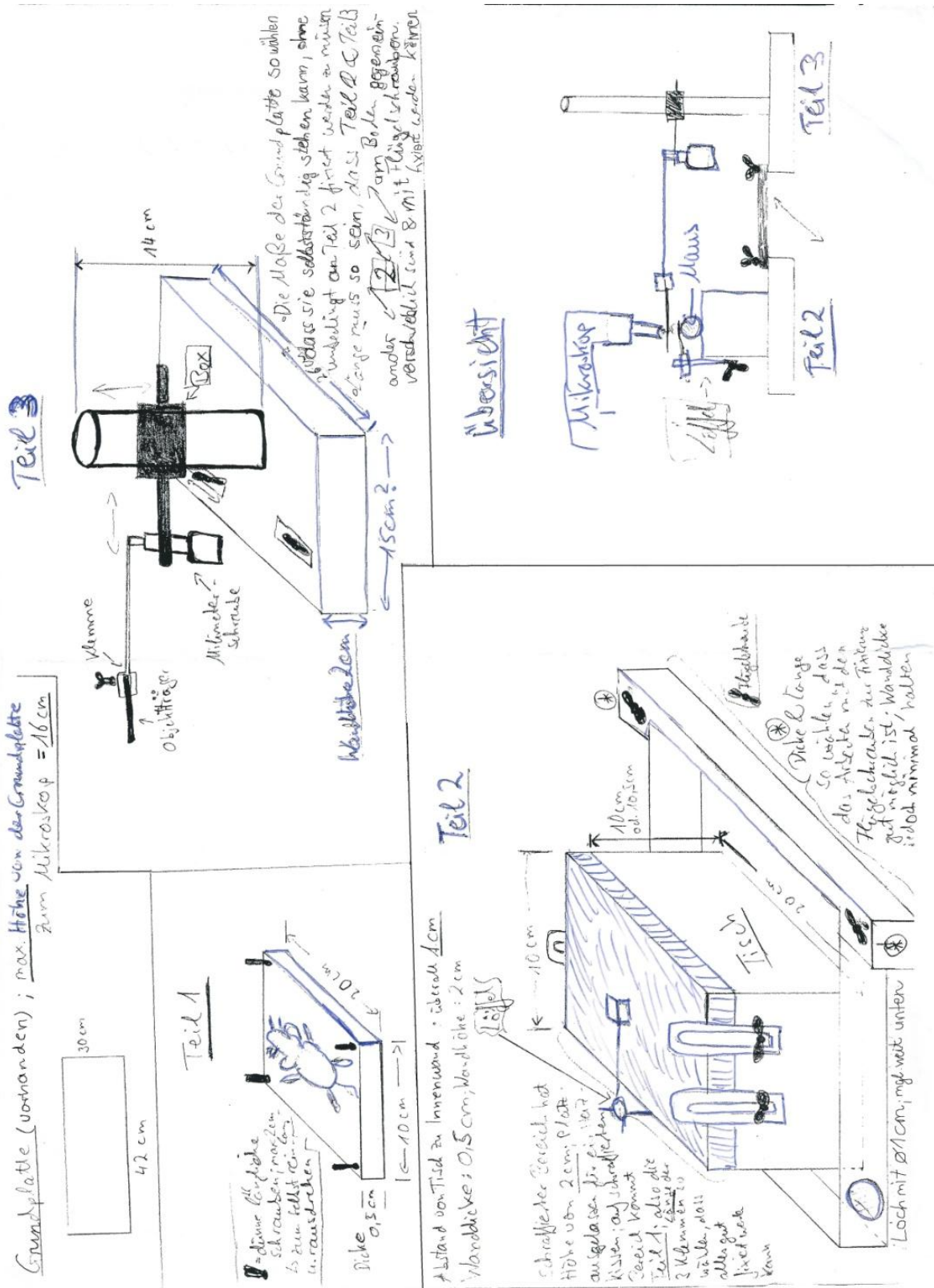


Abb. 9: Skizze I: Untersuchungstisch zur IVM

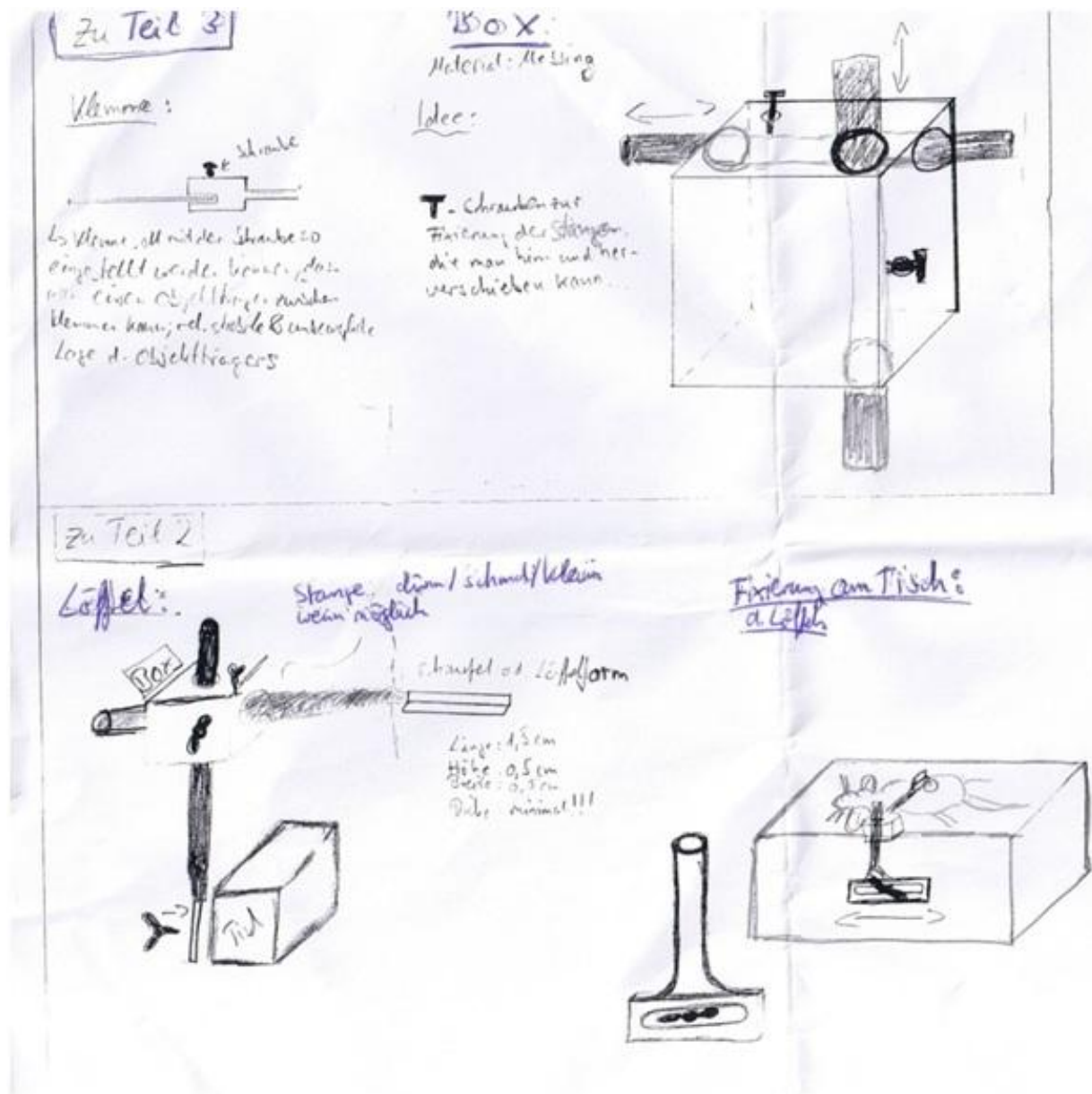
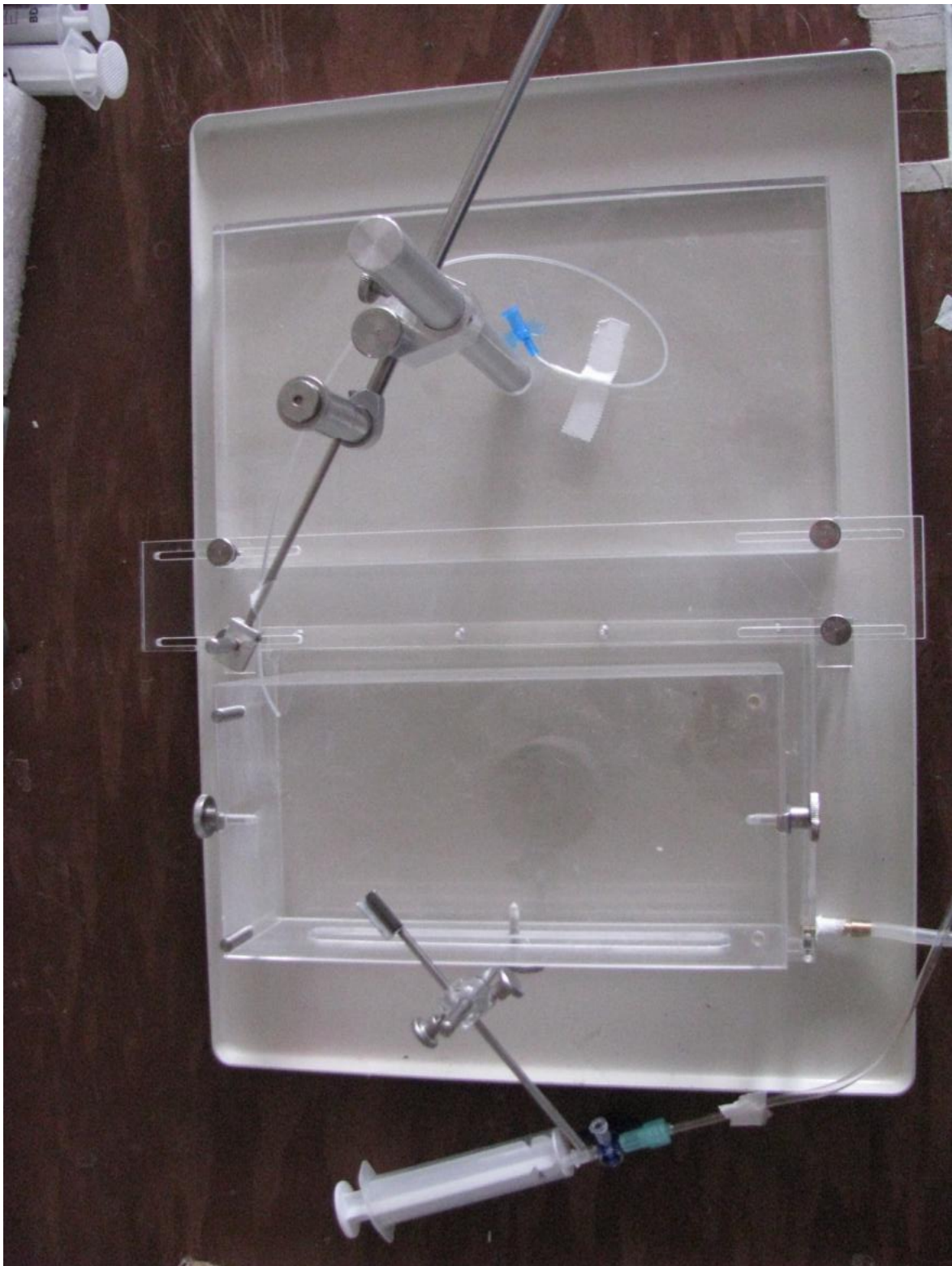


Abb. 10: Skizze II: Untersuchungstisch zur IVM



**Abb. 11: Foto I: Frontalansicht des Untersuchungstisches (ohne Versuchstier)**

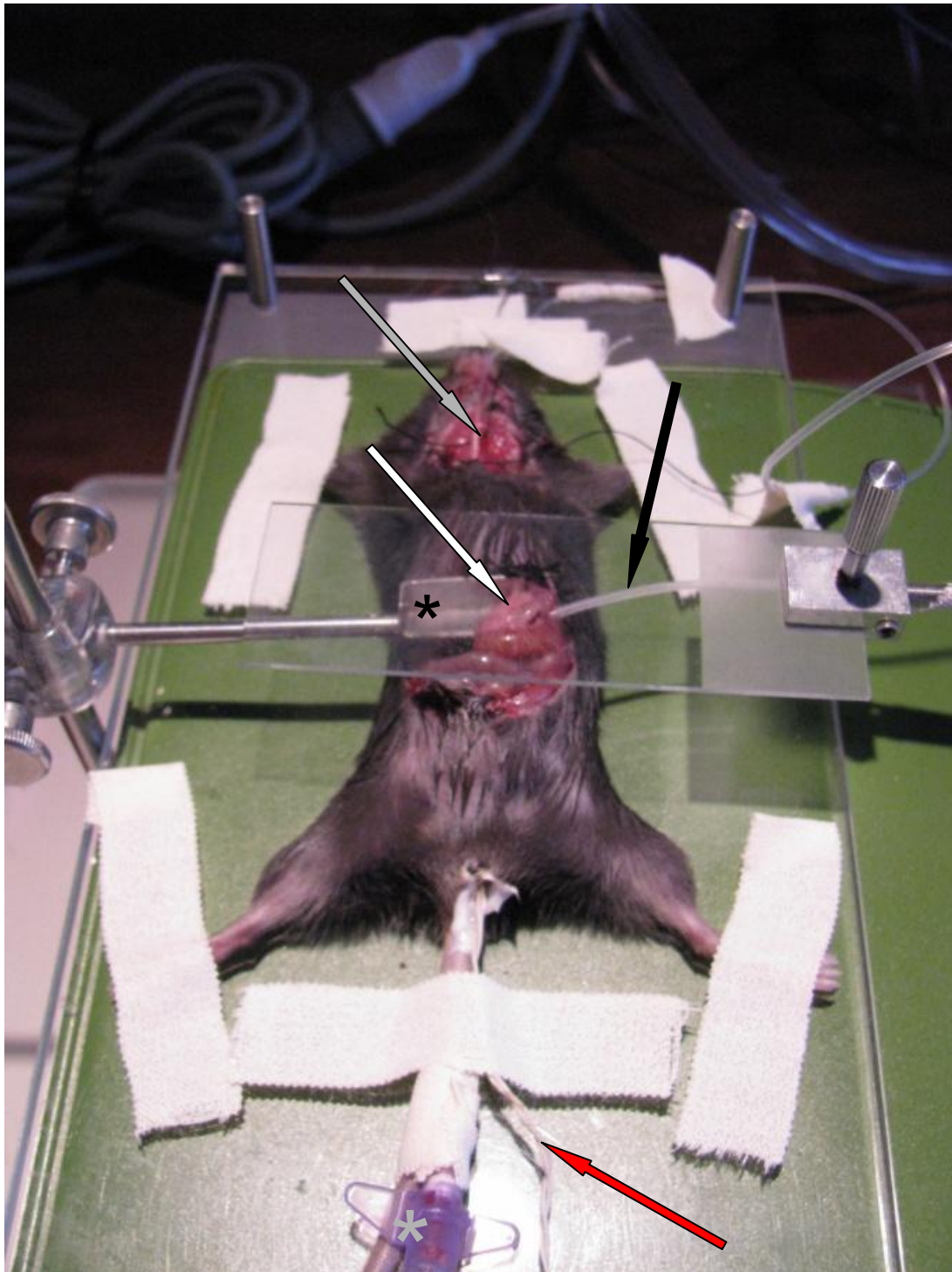




**Abb. 12: Foto II: Vogelperspektive des Untersuchungstisches (ohne Versuchstier)**

#### **4.1.2 Der Aufbau zur Durchführung der Intravitalmikroskopie mit Versuchstier**

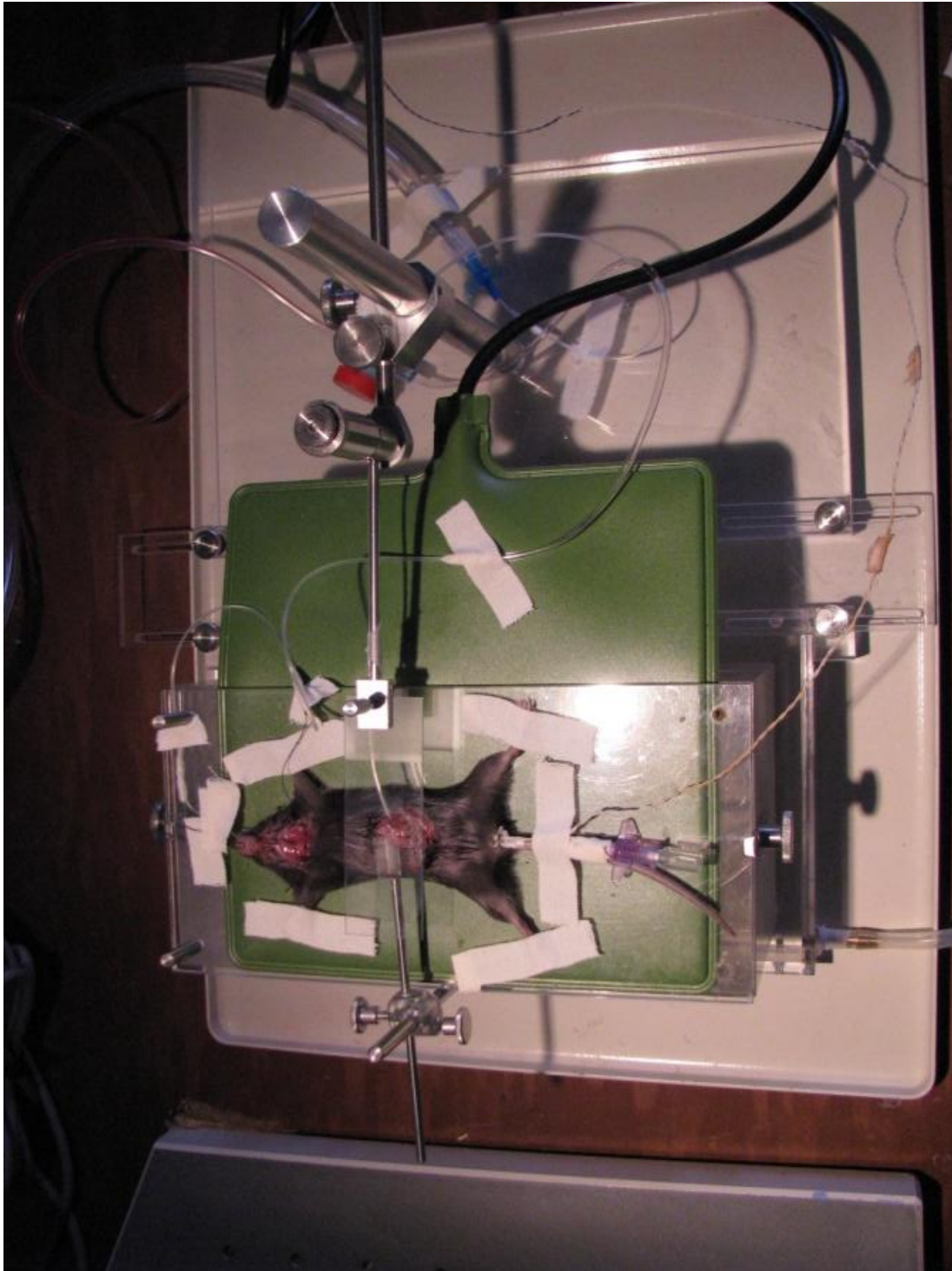
Nachdem der Untersuchungstisch gebaut war, konnte der im Vorfeld bereits in groben Zügen bestehende Versuchsaufbau bzw. der -ablauf der Intravitalmikroskopie verfeinert werden. Der Aufbau wurde in den meisten Abläufen und Einstellungen von der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universität Greifswald im Bereich Forschung übernommen. Die Klinik experimentierte schon seit längerer Zeit mit Ratten als Versuchstieren. Der intravitalmikroskopische Untersuchungsablauf wurde, wie unter Punkt 3.2.5.4 beschrieben, angepasst und durchgeführt. Der endgültige Versuchsaufbau mit Versuchstier wurde unter Berücksichtigung der Versuchstiergröße sowie der Versuchstiereigenheiten und des zu untersuchenden Organs/Tumors angepasst und neu etabliert. Die Abbildungen 13, 14 und 15 zeigen den Aufbau der Intravitalmikroskopie mit bereits narkotisiertem und vorbereitetem Versuchstier. Die Schwanzvene ist bereits punktiert. Die rektale Temperatursonde ist platziert und auch der arterielle Katheter liegt bereits. Ebenfalls ist das Pankreas mit Karzinom schon nach extrakorporal verlagert und mit dem sogenannten „Auslagerungslöffel/Löffel“ abgestützt. Im Bereich des Löffels ist auf der rechten Seite des Bildes der Schlauch für den "hängenden Tropfen" (engl. „hangig drop“) zu sehen. Die Abbildung 13 zeigt eine Nahaufnahme des vorbereiteten Versuchstieres. Die Abbildung 14 zeigt eine Ansicht aus der Vogelperspektive auf den Intravitalmikroskopie-Untersuchungstisch mit dem vorbereiteten Versuchstier. Man kann die zwei Grundkomponenten des Untersuchungstisches erkennen. Die Abbildung 15 zeigt den Intravitalmikroskopie-Untersuchungstisch an seinem Platz unter dem Mikroskop.



**Abb. 13: Nahaufnahme des vorbereiteten Versuchstieres auf dem Tisch**

Gezeigt ist das für die IVM vorbereitete Versuchstier. Der arterielle Katheter (grauer Pfeil) und die Temperatursonde (roter Pfeil) messen die Vitalparameter. Über den venösen Zugang in der Schwanzvene (grauer Stern) kann das Kontrastmittel appliziert werden. Der Auslagerungslöffel (schwarzer Stern) lagert das Pankreas mit Karzinom (weißer Pfeil) nach extrakorporal und verhindert störende Atembewegungen. Der hängende Tropfen (schwarzer Pfeil) verhindert eine Irritation des Pankreas mit Karzinom an der Objektträgerunterseite.





***Abb. 14: Vogelansicht auf den IVM-Tisch mit vorbereitetem Versuchstier***



*Abb. 15: Der IVM-Untersuchungstisch unter dem Mikroskop*

#### **4.2 Vitalparameter: Herzfrequenz, Temperatur, mittlerer arterieller Blutdruck**

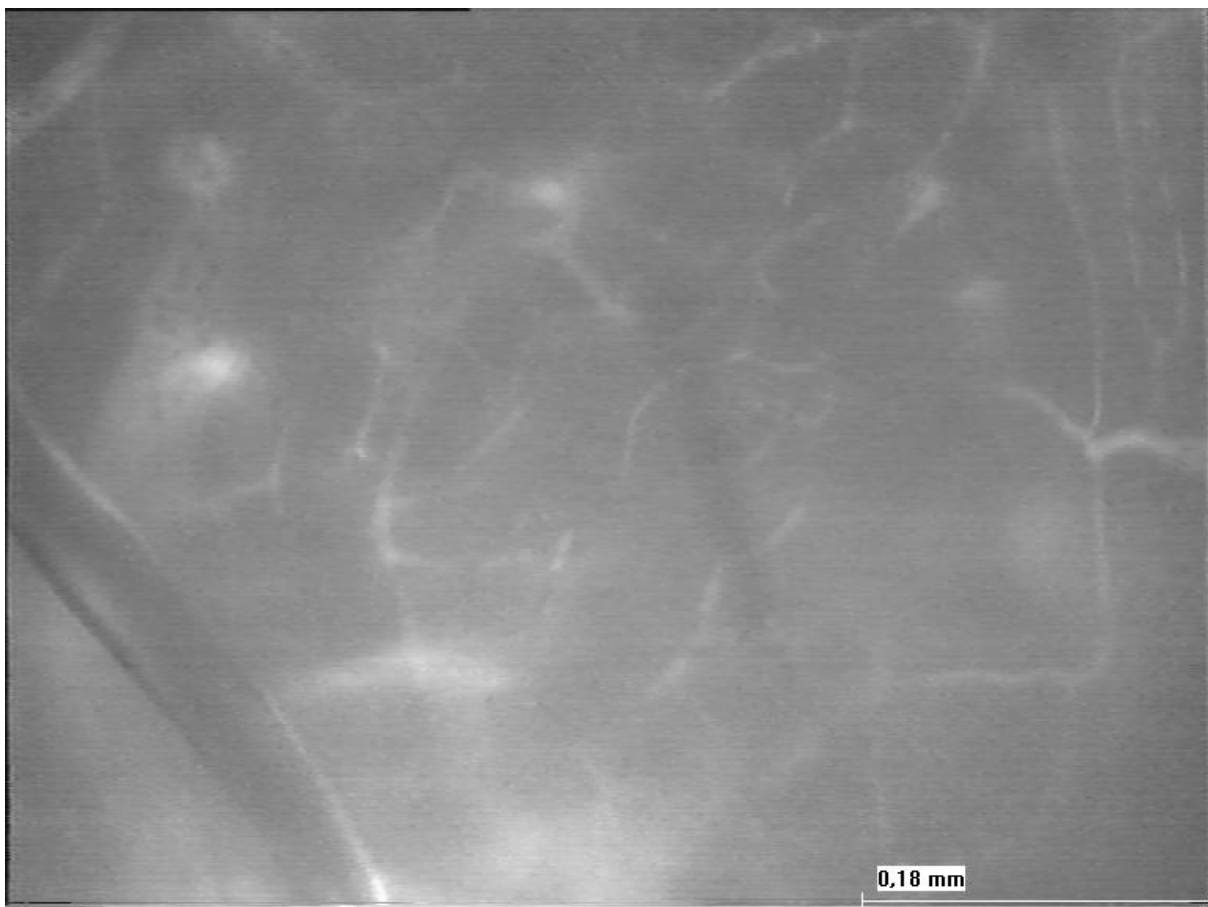
Zu den vorbereitenden Präparationen vor der Durchführung der Intravitalmikroskopie zählten das Legen eines arteriellen Katheters in die Arteria carotis communis und das Platzieren einer rektalen Temperatursonde. Auf diese Weise konnten während der Durchführung der Intravitalmikroskopie die Vitalparameter Herzfrequenz, Körpertemperatur und der mittlere arterielle Blutdruck bestimmt werden.



Die Herzfrequenz lag im Mittel zwischen 245 - 300 Schlägen/Minute. Der mittlere arterielle Blutdruck lag bei  $86 \pm 10$  mmHg und die Körpertemperatur der Versuchstiere bei  $36,6^\circ\text{C}$  ( $\pm 0,7^\circ\text{C}$ ). So wurde gewährleistet, dass die Versuchstiere während der Durchführung der Intravitalmikroskopie unter gleichen Bedingungen untersucht werden konnten.

#### 4.3 Mikrogefäßdichte - microvessel density (MVD)

Nach dem Vorgang des Stressens wurde mit Hilfe der Intravitalmikroskopie die Mikrogefäßdichte im Pankreaskarzinom der Versuchstiere bestimmt. Pro Versuchstier wurden bis zu 7 verschiedene Gesichtsfelder aufgenommen. Die Mikrogefäßdichte wurde bestimmt als vorhandene Mikrogefäßlänge pro vorgegebener Fläche und in  $\text{cm}^{-1}$  angegeben. Die Abbildung 16 zeigt beispielhaft ein Gesichtsfeld eines Kontrolltieres aus der 6 Wochengruppe.



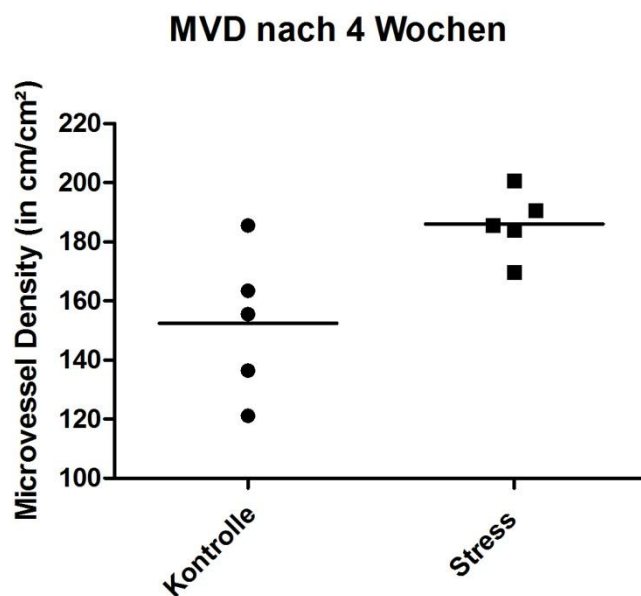
**Abb. 16: Intravitalmikroskopisches Bild der Tumorstromawand**

Darstellung der Mikrogefäße eines Kontrolltieres aus der 6 Wochengruppe. Plasmamarkierung mit FITC-Dextran 5 %. Die Gefäße sind hell, der umliegende Tumor dunkelgrau dargestellt.

### 4.3.1 MVD nach 4 Wochen Stress

In den Abbildungen 17 und 18 werden die Ergebnisse der Intravitalmikroskopie für die Versuchstiere des vierwöchigen Turnus dargestellt.

In der Abbildung 17 werden die Ergebnisse der Kontrollgruppe denen der Stressgruppe gegenübergestellt. Pro Gruppe wurden 5 Versuchstiere mit 7 repräsentativen Gesichtsfeldern untersucht. Bei jedem Versuchstier wurde aus den 7 Gesichtsfeldern dann der arithmetische Mittelwert bestimmt. Je Gruppe sind 5 Ereignisse zu sehen, die jeweils einem arithmetischen Mittelwert der MVD eines Versuchstieres entsprechen. Die Werte für die MVD reichten in der Kontrollgruppe von min.  $121,11\text{cm}^{-1}$  bis max.  $185,54\text{cm}^{-1}$  und in der Stressgruppe von min.  $169,68\text{cm}^{-1}$  bis max.  $200,69\text{cm}^{-1}$ . Der arithmetische Mittelwert ist als horizontale Linie in der Abbildung 17 angedeutet.

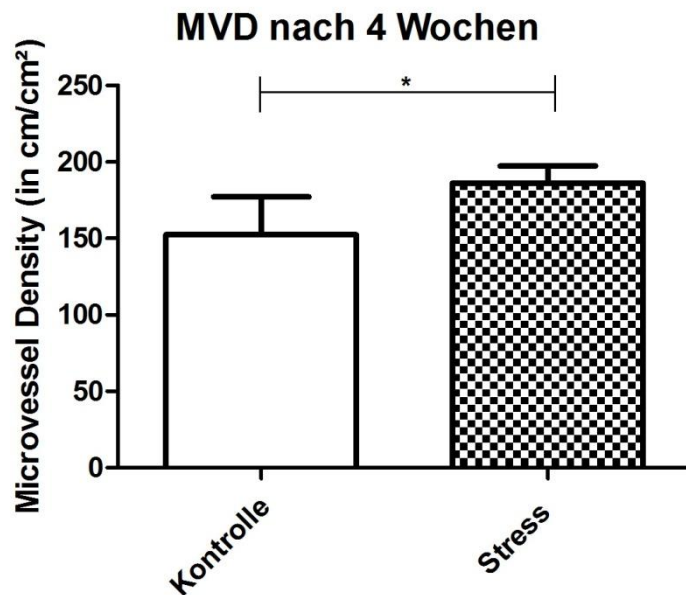


**Abb. 17: Mikrogefäßdichte nach 4 Wochen (Gesichtsfelder)**

Dargestellt ist die Mikrogefäßdichte (MVD) nach 4 Wochen; ein Ereignis entspricht einem arithmetischen Mittelwert aus 7 Gesichtsfeldern eines Versuchstieres; zwei unterschiedliche Gruppen: Kontrollgruppe  $n=5$  und Stressgruppe  $n=5$ ; angedeutet ist der arithmetische Mittelwert als horizontal verlaufende Linie.

Aus den einzelnen Ereignissen wurde dann der arithmetische Mittelwert gebildet. In der Abbildung 18 werden die berechneten Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus der Kontroll- und Stressgruppe gegenübergestellt. Es zeigte sich eine Zunahme der MVD

von  $152,4 \pm 24,83 \text{ cm}^{-1}$  in der Kontrollgruppe auf  $186,1 \pm 11,27 \text{ cm}^{-1}$  in der Stressgruppe unter chronischen Stressbedingungen. Dieser Unterschied war mit  $p=0,03$  signifikant.



**Abb. 18: Mikrogefäßdichte nach 4 Wochen (MW $\pm$ SD)**

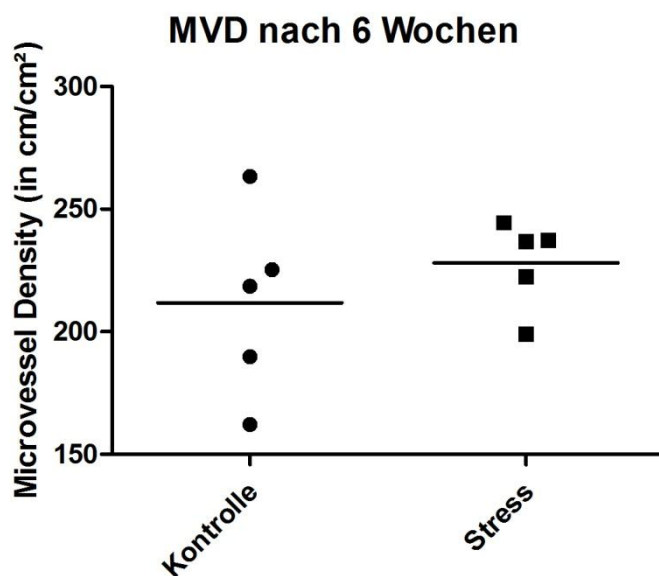
Dargestellt ist die Mikrogefäßdichte nach 4 Wochen; Kontrollgruppe  $n=5$  und Stressgruppe  $n=5$ ; Graphen repräsentieren den arithmetischen Mittelwert (MW) und die Standardabweichung ( $\pm SD$ );

\* =  $p=0,03$ .

### 4.3.2 MVD nach 6 Wochen Stress

In den Abbildungen 19 und 20 werden die Ergebnisse der Intravitalmikroskopie für die Versuchstiere des sechswöchigen Turnus dargestellt.

In der Abbildung 19 werden die Ergebnisse der Kontrollgruppe denen der Stressgruppe gegenübergestellt. Pro Gruppe wurden 5 Versuchstiere mit 7 repräsentativen Gesichtsfeldern untersucht. Bei jedem Versuchstier wurde aus den 7 Gesichtsfeldern dann der arithmetische Mittelwert bestimmt. Je Gruppe sind 5 Ereignisse zu sehen, die jeweils einem arithmetischen Mittelwert der MVD eines Versuchstieres entsprechen. Die Werte für die MVD reichten in der Kontrollgruppe von min.  $162,22\text{cm}^{-1}$  bis max.  $263,37\text{cm}^{-1}$  und in der Stressgruppe von min.  $199,15\text{cm}^{-1}$  bis max.  $244,56\text{cm}^{-1}$ . Der arithmetische Mittelwert ist als horizontale Linie in Abbildung 19 angedeutet.

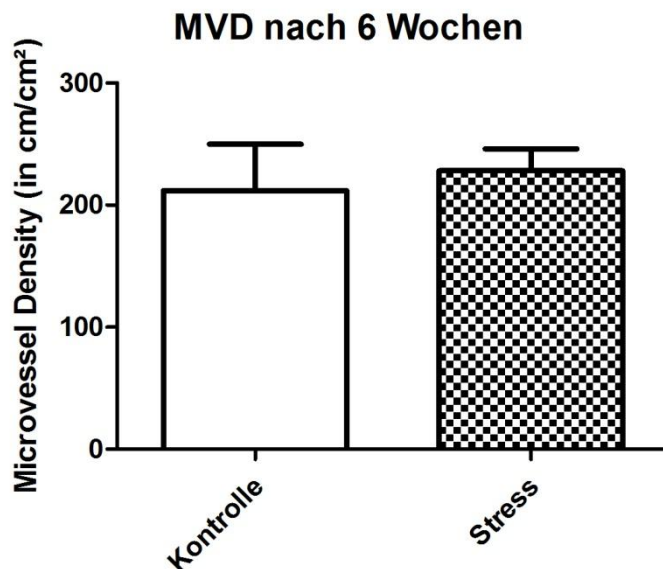


**Abb. 19: Mikrogefäßdichte nach 6 Wochen (Gesichtsfelder)**

Dargestellt ist die Mikrogefäßdichte (MVD) nach 6 Wochen; ein Ereignis entspricht einem arithmetischen Mittelwert aus 7 Gesichtsfeldern eines Versuchstieres; zwei unterschiedliche Gruppen: Kontrollgruppe  $n=5$  und Stressgruppe  $n=5$ ; angedeutet ist der arithmetische Mittelwert als horizontal verlaufende Linie.

Aus den einzelnen Ereignissen wurde dann der arithmetische Mittelwert gebildet. In der Abbildung 20 werden die berechneten Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus der Kontroll- und Stressgruppe gegenübergestellt. Es zeigte sich eine Zunahme der MVD

von  $211,8 \pm 38,17 \text{ cm}^{-1}$  in der Kontrollgruppe auf  $228,1 \pm 18,04 \text{ cm}^{-1}$  in der Stressgruppe unter chronischen Stressbedingungen. Dieser Unterschied war jedoch mit  $p=0,42$  nicht signifikant.



**Abb. 20: Mikrogefäßdichte nach 6 Wochen (MW $\pm$ SD)**

Dargestellt ist die Mikrogefäßdichte nach 6 Wochen; Kontrollgruppe  $n=5$  und Stressgruppe  $n=5$ ; Graphen repräsentieren den arithmetischen Mittelwert (MW) und die Standardabweichung ( $\pm$ SD);  $p=0,42$ .

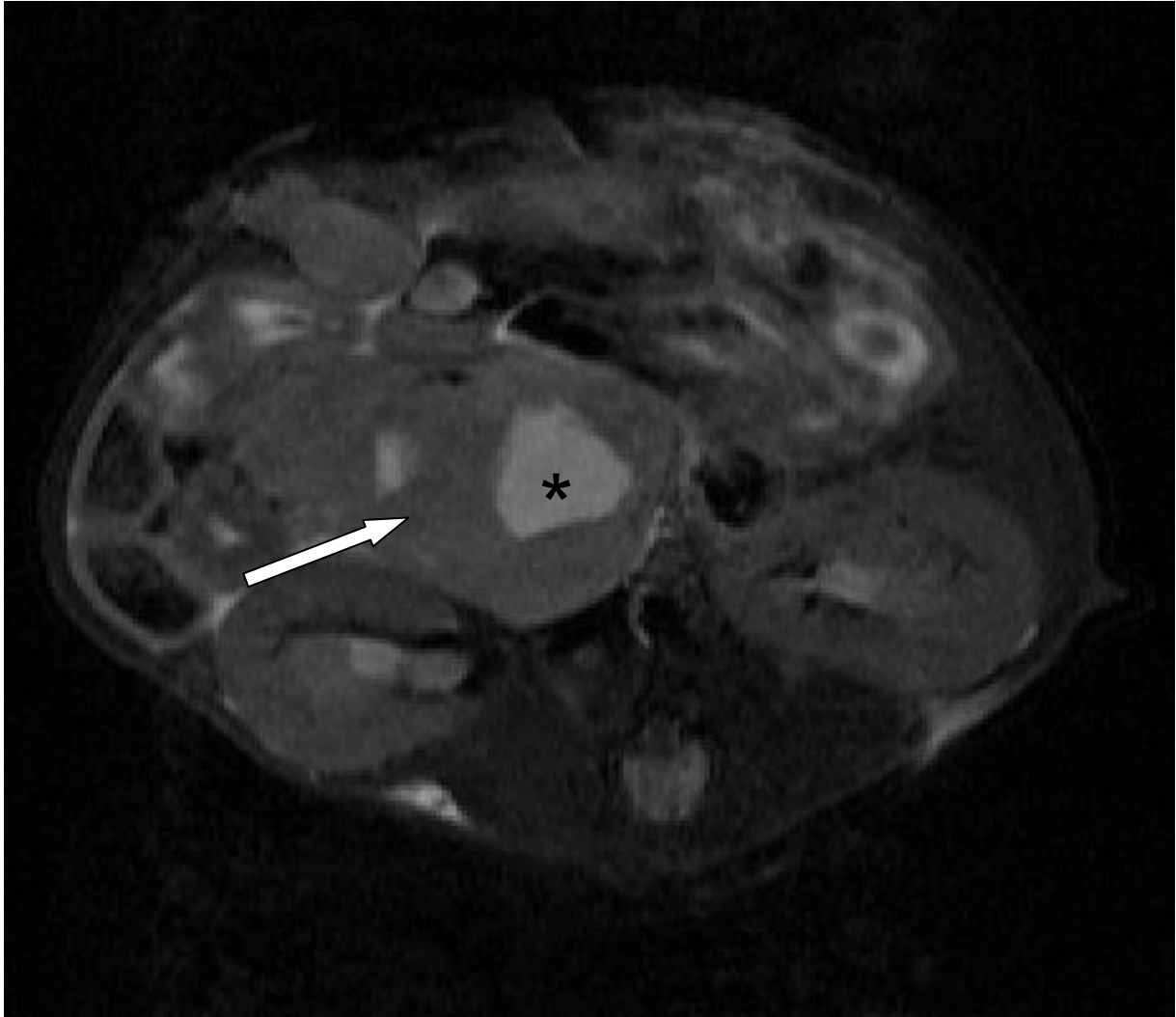
## 4.4 Tumorvolumen

### 4.4.1 Tumorvolumen nach 4 Wochen

Nachdem die Versuchstiere vier Wochen lang gestresst wurden, erfolgte bei dieser Gruppe und bei der Kontrollgruppe vor der Durchführung der Intravitalmikroskopie die Untersuchung des Tumors mittels Kleintier-MRT.

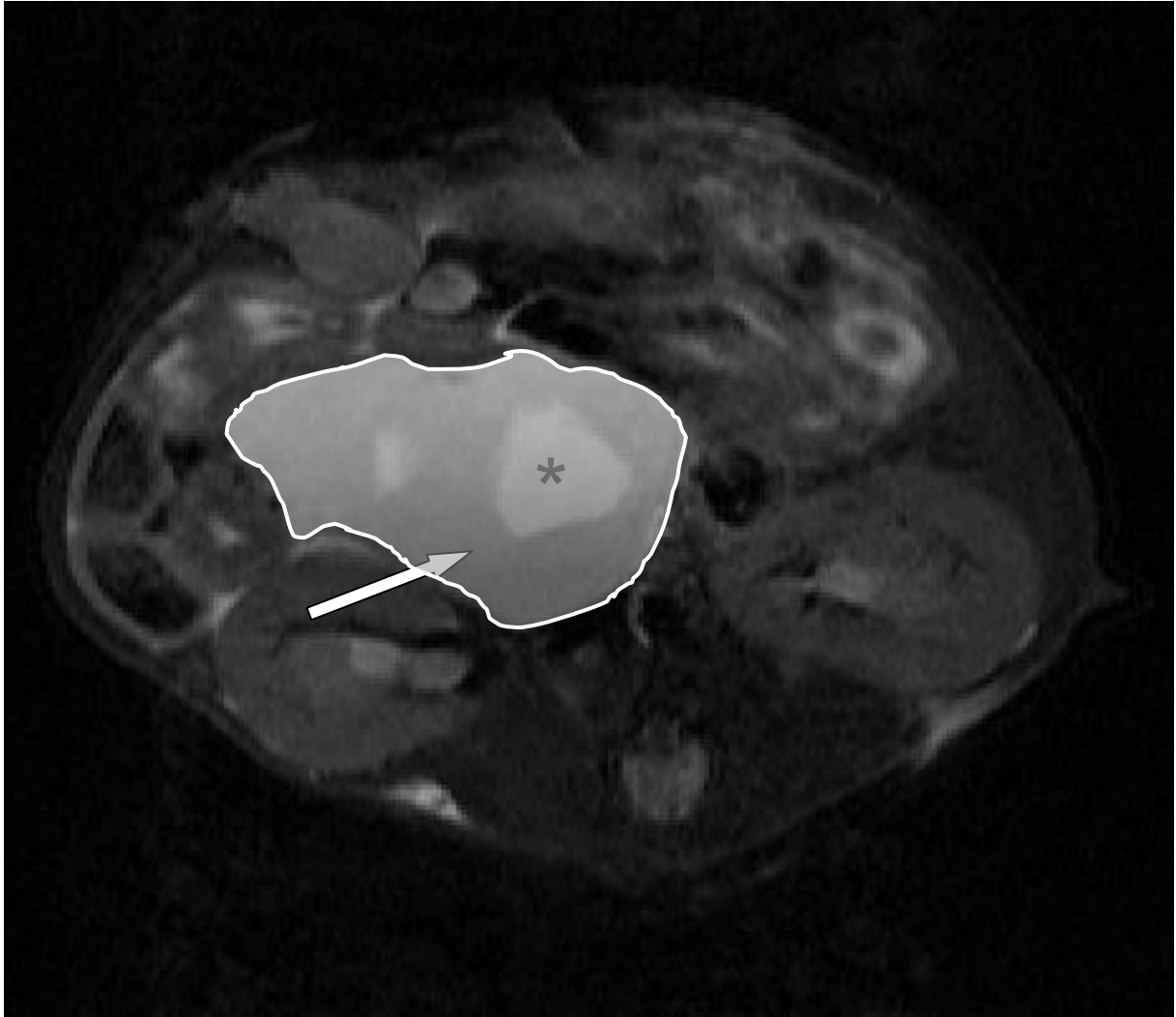
Die Auswertung der Untersuchungen erfolgte am Computer mit Hilfe von MIPAV. Es wurde pro MRT-Schnittbild eine sogenannte Interessenregion (ROI („Region of Interest“)) markiert, und das Programm errechnete dann das Tumorvolumen.

Die Abbildungen 21 und 22 zeigen dieselben transversalen MRT-Schnitte des Pankreaskarzinoms (weißer Pfeil) eines gestressten Versuchstieres, einmal ohne (Abb. 21) und einmal mit eingezeichneter ROI (grau markiert) (Abb. 22).



**Abb. 21: MRT-Bildgebung des murinen Pankreaskarzinoms I**

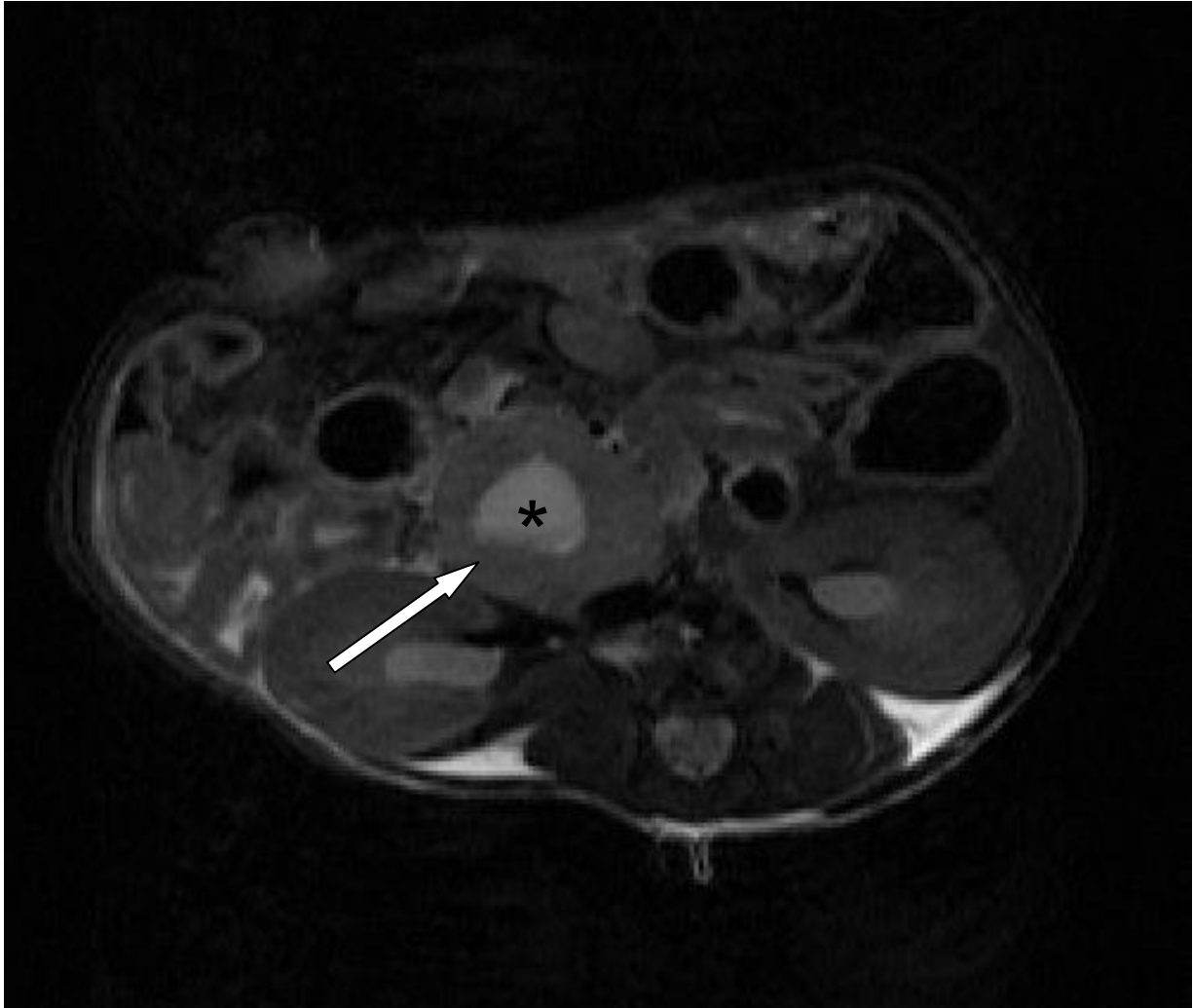
Dargestellt ist ein transversaler MRT-Schnitt des Pankreaskarzinoms (weißer Pfeil) mit vorhandener Tumornekrose (schwarzer Stern) eines gestressten Versuchstieres aus der 4 Wochengruppe ohne eingezeichneter ROI.



**Abb. 22: MRT-Bildgebung des murinen Pankreaskarzinoms II**

Dargestellt ist ein transversaler MRT-Schnitt des Pankreaskarzinoms (weißer Pfeil) mit vorhandener Tumornekrose (schwarzer Stern) eines gestressten Versuchstieres aus der 4 Wochengruppe mit eingezeichneter ROI (Region of Interest = hier das Pankreaskarzinom in seiner transversalen Ausdehnung (weiß umrandet und grau markiert)).

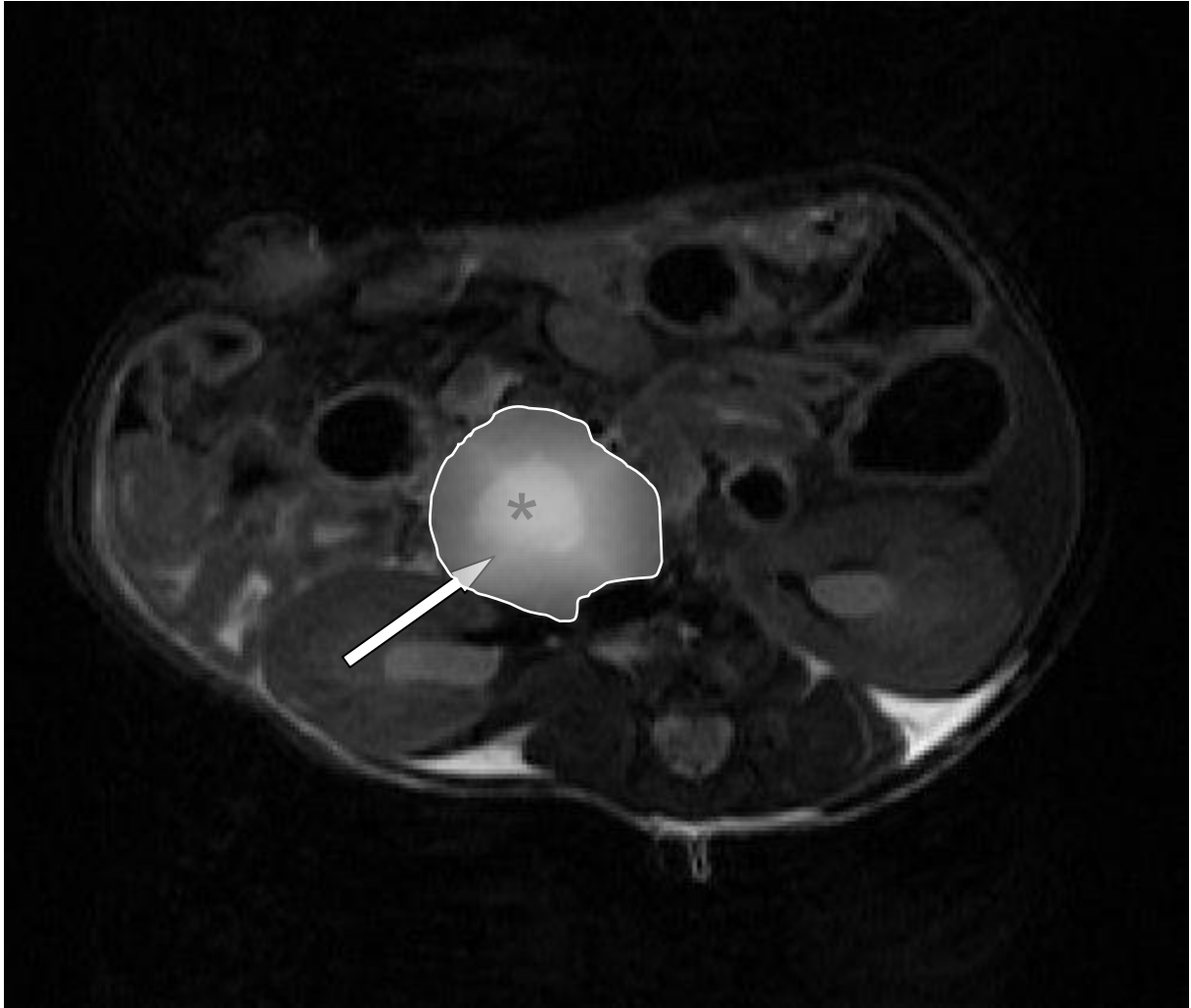
Die Abbildungen 23 und 24 zeigen dieselben transversalen MRT-Schnitte des Pankreaskarzinoms (weißer Pfeil) eines Versuchstieres aus der Kontrollgruppe der 4 Wochengruppe einmal ohne (Abb.23) und einmal mit eingezeichneter ROI (grau markiert) (Abb. 24).



**Abb. 23: MRT-Bildgebung des murinen Pankreaskarzinoms III**

Dargestellt ist ein transversaler MRT-Schnitt des Pankreaskarzinoms (weißer Pfeil) mit vorhandener Tumornekrose (weißer Stern) eines Versuchstieres aus der Kontrollgruppe der 4 Wochengruppe ohne eingezeichneter ROI.

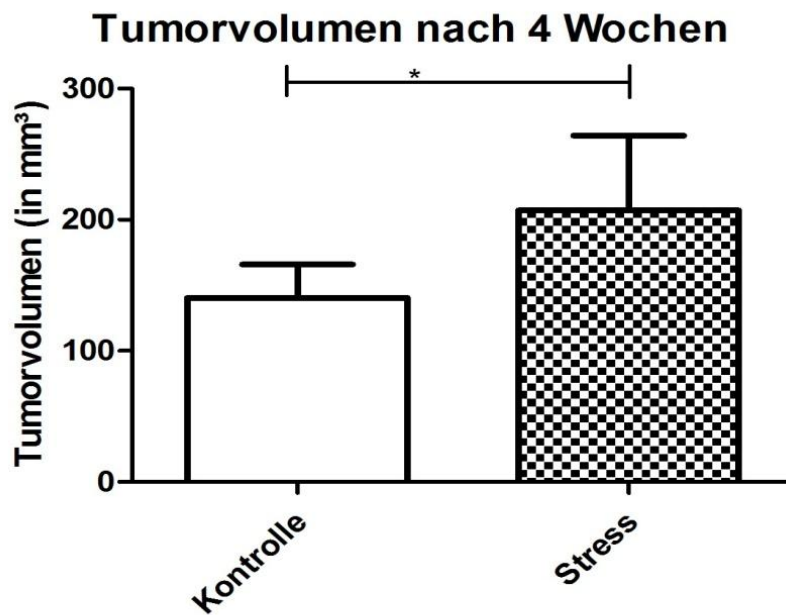




**Abb. 24: MRT-Bildgebung des murinen Pankreaskarzinoms IV**

Dargestellt ist ein transversaler MRT-Schnitt des Pankreaskarzinoms (weißer Pfeil) mit vorhandener Tumornekrose (schwarzer Stern) eines Versuchstieres aus der Kontrollgruppe der 4 Wochengruppe mit eingezeichneter ROI (Region of Interest = hier das Pankreaskarzinom in seiner transversalen Ausdehnung (weiß umrandet und grau markiert)).

In der Abbildung 25 werden die berechneten Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Ergebnisse aus der Stress- und Kontrollgruppe gegenübergestellt. Es zeigte sich eine Zunahme des Tumorzvolumens von  $140,3 \pm 25,53 \text{ mm}^3$  in der Kontrollgruppe auf  $207,0 \pm 57,0 \text{ mm}^3$  in der Stressgruppe unter chronischen Stressbedingungen. Dieser Unterschied war mit  $p=0,03$  signifikant.



**Abb. 25: Tumorzvolumen nach 4 Wochen**

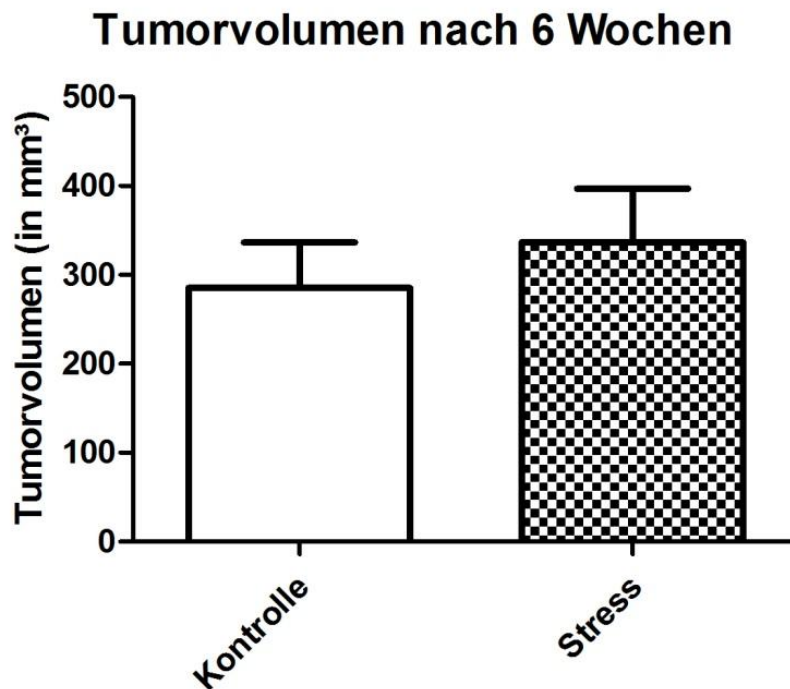
Dargestellt ist das Tumorzvolumen nach 4 Wochen; Kontrollgruppe  $n=5$  und Stressgruppe  $n=5$ ; Graphen repräsentieren den arithmetischen Mittelwert (MW) und die Standardabweichung ( $\pm$ SD);

\* =  $p=0,03$ .

#### 4.4.2 Tumorstadium nach 6 Wochen

Nach erfolgter Intravitalmikroskopie wurden die Tumoren aus den Versuchstieren beider 6 Wochengruppen heraus präpariert und anschließend mit einer elektronischen Schieblehre vermessen und das Volumen rechnerisch näherungsweise bestimmt.

In der Abbildung 26 werden die berechneten Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Ergebnisse aus der Stress- und Kontrollgruppe gegenübergestellt. Es zeigte sich zwar eine Zunahme des Tumorstadiums von  $285 \pm 51,60 \text{ mm}^3$  in der Kontrollgruppe auf  $336,6 \pm 60,17 \text{ mm}^3$  in der Stressgruppe unter chronischen Stressbedingungen, jedoch war dieser Unterschied mit  $p=0,31$  nicht signifikant.



**Abb. 26: Tumorstadium nach 6 Wochen**

Dargestellt ist das Tumorstadium nach 6 Wochen; Kontrollgruppe  $n=5$  und Stressgruppe  $n=5$ ; Graphen repräsentieren den arithmetischen Mittelwert (MW) und die Standardabweichung ( $\pm$ SD);  $p=0,31$ .

## 5 Diskussion

Die Angiogenese ist über die Jahre immer mehr in den Fokus der Forschungen gerückt. Man nahm zunächst an, dass sich die Gefäße in den Tumoren aus schon vorhandenen Tumorgefäßen entwickeln würden. Im Verlauf der Jahre konnte allerdings nachgewiesen werden, dass bis zu 40 % der Endothelzellen eines Tumors aus den Progenitorzellen, die direkt aus dem Knochenmark stammen, gebildet werden. Hierbei übernimmt VEGF mit seinen vielen Untergruppen eine entscheidende Rolle. Allerdings kann VEGF nicht alleine, sondern nur in Kombination mit anderen Mediatoren, wie z. B. Angiopoetin oder PDGF (platelet-derived growth factors) zu einer stabilen Angiogenese beitragen. Dieses Wissen eröffnete dann im Nachgang zahlreiche neue therapeutische Möglichkeiten und Ansatzpunkte zur Beeinflussung der Tumordurchblutung und somit auch des Tumorwachstums [156].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur *in vivo* Messung von Blutgefäßen mittels Intravitalmikroskopie am murinen orthotopen syngenem Pankreaskarzinom zu etablieren, um dann in einem nächsten Schritt den Einfluss chronischen Stresses auf die Angiogenese zu untersuchen. Das Tumorwachstum sollte zu Kontrollzwecken gleichzeitig bzw. einen Tag vor der Durchführung der Intravitalmikroskopie mitbestimmt werden. Die Annahme war, dass sich chronischer Stress begünstigend auf die Angiogenese und damit auf das Tumorwachstum auswirkt und somit einen negativen Einfluss auf die Prognose des Pankreaskarzinoms haben könnte.

In der Literatur konnten diverse etablierte Pankreaskarzinommodelle in verschiedenen Spezies, wie z. B. in der Ratte und in der Maus, gefunden werden [157, 158]. Hierbei wurden zum Teil transgene Modelle verwendet. Bei diesem Modelltyp kommt es durch die Manipulation des genetischen Gutes zu einer spontanen Entstehung von Pankreaskarzinomen [159]. Weiterhin wurden Modelle mit einer xenogenen Implantation entwickelt und benutzt. Die Nachteile dieser beiden Modelle für die Zwecke dieser Arbeit liegen zum einen im unspezifischen Zeitpunkt der Karzinomentstehung (transgen) und zum anderen in der Immundefizienz der Versuchstiere (xenogen) [160]. Bei einem anderen Modelltyp erfolgte eine syngene Implantation von Karzinomzellen, entweder heterotop oder orthotop [159]. Da das für die vorliegende Arbeit relevante Tumormikromilieu inklusive der Wachstumsfaktoren, die die Mikrogefäßdichte und die Tumorgöße beeinflussen, möglichst genau

dargestellt werden sollte, wurde sich im Rahmen dieser Arbeit für die orthotope syngene Implantation von Pankreaskarzinomzellen der murinen Zelllinie 6606-PDA entschieden [44, 161]. Die Vorteile dieses Modells bzw. dieser Implantationsart liegen in der Vorhersagbarkeit des Zeitpunktes der Karzinomentstehung. Außerdem besitzen die Versuchstiere ein intaktes Immunsystem, welches als wichtiger Regulationsprozess der Karzinogenese anzusehen ist [162, 163]. Die Etablierung der Methode der intravitalmikroskopischen Untersuchung sollte somit über ein murines orthotopes syngenes Pankreaskarzinommodell erfolgen.

Vor der Intravitalmikroskopie wurde ein Stressmodell zur Simulation von chronischem Stress, bestehend aus räumlichem Engstress und akustischem Stress, an den Versuchstieren durchgeführt [164, 165]. Der Einfluss chronischen Stresses wurde über die Jahre in den unterschiedlichsten Tumorentitäten mit den verschiedensten Modellen untersucht. So konnte z. B. in einem Karzinommodell des Ovars mit zwei verschiedenen Zelllinien gezeigt werden, dass die stressrelevanten Hormone (wie z. B. Norepinephrin/Noradrenalin, Epinephrin/Adrenalin, Isoproterenol und Kortisol) die Ausschüttung von VEGF stimulieren und somit direkten Einfluss auf die Tumorprogression haben [166]. Auch der Stress als solcher konnte in manchen Tumorentitäten, wie z. B. beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, hier über die Aktivierung des sympathischen Systems, als treibende Kraft der Tumorentstehung und -ausdehnung nachgewiesen werden [167].

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass VEGF eine Schlüsselrolle in der Angiogenese einnahm und wesentlich für das Wachstum und die Metastasierung vieler humaner Karzinome war, so auch im humanen duktaalen Pankreasadenokarzinom, kurz Pankreaskarzinom. In ca. 70 % der *in vitro* analysierten Pankreaskarzinomzelllinien kam es zu einer Überexprimierung von VEGF [168]. Eine andere Studie bestätigte diese Aussage. Hier wurden über eine Bauchkammer an den Versuchstieren, in diesem Fall an Mäusen, mit der intravitalmikroskopischen Untersuchung die Angiogenese und die mikrovaskulären Funktionen während des Tumorwachstums *in vivo* an orthotopen und ektopen humanen Pankreaskarzinomen der Zellreihe Panc-1 untersucht. Es zeigte sich, dass orthotope Pankreaskarzinome vermehrt (autokrin und/oder parakrin) VEGF 121 und VEGF 165 exprimierten und über die Beeinflussung der Mikrogefäßdichte (MVD) und der Hyperpermeabilität die Blutversorgung begünstigten/unterstützten und somit zu einem vermehrten Tumorwachstum führten [169]. Dieses Verhalten bestätigte eine

weitere Arbeit. Es konnte gezeigt werden, dass über eine gegenseitige Beeinflussung der Pankreaskarzinomzellen und der dukталen Epithelzellen des Pankreas beim sog. „crosstalk“ eine autokrine Stimulierung der Katecholamine erfolgte. Dieses führte über einen betaadrenergen Signalweg ebenfalls zu einer Beeinflussung des Tumorwachstums [170].

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression von VEGF mit einer schlechten Prognose des Pankreaskarzinoms einherging. Ebenfalls in dieser Studie wurden im Pankreaskarzinom die angiogenen Faktoren, wie VEGF, Id-1 (DNA-Bindungsprotein-Inhibitor, zuständig für z. B. das Zellwachstum) und CD34 (Membranprotein, Vorkommen bei der Hämatopoese) untersucht. Die vermehrte Expression von VEGF, Id-1 und CD34 führte zur vermehrten Ausbildung der MVD, welche als ungünstiger prognostischer Faktor für das Überleben bewertet wurde [112]. Eine andere Studie bestätigte diesen Zusammenhang. Hierbei wurde der Einfluss der MVD auf bestimmte klinisch-pathologische Kriterien der Patienten untersucht. Es zeigte sich, dass eine hohe periphere MVD im humanen Pankreaskarzinom mit dem Auftreten von Lebermetastasen und einer schlechteren Prognose für das Langzeitüberleben assoziiert war [115]. Aus diesem Grund war eine genaue Messung der MVD entscheidend, um so eine umfassende Betrachtung der angiogenen Faktoren und der Angiogenese im Pankreaskarzinom zu ermöglichen [171].

Wie genau aber wurde bzw. wird die MVD gemessen bzw. bestimmt? In den letzten Jahrzehnten wurde in den meisten Studien die sog. „hot spot Methode“, die von Weidner et al. im Jahre 1991 eingeführt wurde, verwendet. Hierbei handelte es sich um eine histologische Methode, bei der eine immunhistochemische Anfärbung mit speziellen Antikörpern erfolgte. Weidner et al. führten diese Methode erstmalig bei der Untersuchung des Mammakarzinoms ein [172]. Takagi et al. konnten jedoch zeigen, dass sich diese Methode in der Urform in anderen Studien bzgl. des Pankreaskarzinoms nur bedingt einsetzen ließ bzw. nur bedingt Rückschlüsse auf die Prognose liefern konnte. Dieses lag vor allem an den gewählten Antikörpern zum Anfärben und den untersuchten Arealen im Tumor. Auch zeigte sich, dass die Antikörper unspezifisch viele andere Zellen mit anfärbten. Dies führte zu Unstimmigkeiten darüber, ob das angefärbte Areal nun ein Mikrogefäß war oder nicht. Deshalb entwickelten Takagi et al. die sog. „Lumen Methode“. Diese Methode war eine Modifikation der „hot spot Methode“. Auch hierbei erfolgte eine

immunhistochemische Anfärbung. Jedoch wurden nur die angefärbten Bereiche als Mikrogefäß gezählt, die auch ein Lumen aufwiesen. In einer anderen Arbeit untersuchten Takagi et al. die MVD am humanen Pankreaskarzinom mit immunhistochemischer Anfärbung unter Verwendung verschiedener Mikroskope. Es zeigte sich ein eher heterogenes Bild bei den Ergebnissen, jedoch mit der klaren Schlussfolgerung, dass eine genaue Messung der MVD entscheidend war/ist [171]. In einer anderen Arbeit wurde die Echtzeit-Aufnahme am lebenden Tier benutzt, um das Tumorwachstum und das Metastasierungsverhalten *in vivo* zu untersuchen. Hierbei wurden Nacktmäusen in den Körper des Pankreas zuvor manipulierte humane Pankreaskarzinomzellen der Zelllinien BxPc-3 oder MiaPaCa-2, die ein grünlich fluoreszierendes Protein (GFP) exprimierten, appliziert. Mittels eines optischen Fluoreszenzmikroskops oder einer fluoreszierenden Lichtbox konnte eine Ganzkörperuntersuchung des Tumorwachstums über die Zeit erfolgen. Das Ergebnis zeigte eine konstante Zunahme der Tumorgöße über 100 Tage. Leider konnten in diesem orthotopen Modell keine Rückschlüsse auf die Tumorangiogenese gezogen werden [173]. Bei einer anderen Arbeit war die Vorgehensweise ähnlich. Hier wurde ebenfalls bei Nacktmäusen, neben einem Maus-Lewis-Lungenkarzinom, einem Mammakarzinom und einem humanen Prostatakarzinom, auch ein orthotop implantiertes humanes Pankreaskarzinom der Zellreihe BxPc-3 verwendet. Durch das GFP und ein optisches Fluoreszenzmikroskop zeigte sich der Tumor angefärbt, die Gefäße wurden ohne Färbung dunkel dargestellt, sodass eine Differenzierung möglich war. Somit konnte eine *in vivo* bzw. intravitale und physiologische Untersuchung des Tumormikromilieus durchgeführt werden. Die Messung der MVD musste folglich nicht mehr nur über die immunhistochemische Anfärbung nach Tötung des Tieres erfolgen [174].

Über die Jahre wurden eine Vielzahl an Methoden, mit Hauptfokus auf Tumorproliferation, -migration und Quantifizierung der Gefäßdichte, entwickelt, um die Aktivitäten während der Angiogenese *in vivo* und *in vitro* untersuchen zu können. Ein Beispiel hierfür sei eine Arbeit von Ryschich et al.. Hier wurde an transgenen RIP1-Tag5-Mäusen und an nicht transgenen C3HebFe-Mäusen die Intralvitalmikroskopie als direkte Visualisierungsmethode der Mikrozirkulation und als Möglichkeit zur Messung der MVD am normalen Pankreas, am pankreatischen Gefäßinseln und an einem Pankreastumor *in vivo* eingesetzt [175]. In einer anderen Studie sollte der Effekt von TNP-470 (AGM-1470), einem Inhibitor der Angiogenese,

untersucht werden. Hierzu wurden BALB/c- und C57BL/6-Mäuse einerseits mit einer Rückenhautkammer und andererseits mit durch GFP modifizierten murinen Pankreaskarzinomzellen der Zellreihe Panc-02-H0 versehen. Eine genaue Betrachtung des Beginns und der Frühphase der Tumorangiogenese *in vivo* konnte nur mit Hilfe der Intravitalmikroskopie und nicht mit den konventionellen immunhistochemischen Verfahren ermöglicht werden. Die Effektivität von TNP-470 wurde anhand der MVD und der Vergrößerung des Tumorareals, die beide durch die Intravitalmikroskopie gemessen wurden, untersucht [104].

Als Ergebnis haben alle zuvor genannten Arbeiten gemein, dass die MVD während der Dauer des Tumorwachstums zunimmt bzw. andersherum, dass die Erhöhung der MVD einen wesentlichen Einfluss auf das Wachstum des Tumors ausübt.

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand nun darin, den Einfluss chronischen Stresses auf die MVD zu untersuchen. Die Untersuchung der MVD erfolgte in dieser Arbeit aus den oben aufgeführten Gründen mit Hilfe der IVM und einem Kontrastmittel zum Anfärben des Plasmas und damit zur Darstellung der Gefäße. Es konnte nachgewiesen werden, dass es in der 4 Wochengruppe zu einer Zunahme der MVD von  $152,4 \pm 24,83 \text{ cm}^{-1}$  in der Kontrollgruppe auf  $186,1 \pm 11,27 \text{ cm}^{-1}$  in der Stressgruppe unter chronischen Stressbedingungen kam. Dieser Unterschied war mit  $p < 0,05$  signifikant. In der 6 Wochengruppe wurde ebenfalls eine Zunahme der MVD von  $211,8 \pm 38,17 \text{ cm}^{-1}$  in der Kontrollgruppe auf  $228,1 \pm 18,04 \text{ cm}^{-1}$  unter chronischen Stressbedingungen in der Stressgruppe beobachtet. Dieser Anstieg war jedoch mit  $p = 0,42$  nicht signifikant.

In der Literatur sind kaum Quellen vorhanden, die den Einfluss chronischen Stresses auf die MVD untersuchen. In einer Arbeit von Masayasu Jo et al. wurde der Einfluss chronischen oxydativen Stresses auf die Tumorangiogenese von humanen hepatozellulären Karzinomen untersucht. Das Ergebnis war, dass der Grad des oxydativen Stresses mit dem Grad der Ausprägung der VEGF-Expression und der Bildung der MVD assoziiert war. Anzumerken ist, dass bei der Untersuchung der MVD erneut eine immunhistochemische Anfärbung und die Bestimmung mit der „hot spot Methode“ erfolgte [176]. Bei einer anderen Arbeit von Shahzad et al. sollte der Einfluss chronischen Stresses auf FosB (ein Protein, welches vom „FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B“ kodiert wird) und Interleukin-8 auf das Tumorwachstum und das Metastasierungsverhalten in einem murinen Ovarialkarzinommodell untersucht werden. Es zeigte sich, dass im Vergleich zur



Kontrollgruppe in der Stressgruppe die MVD signifikant erhöht war. Aber auch bei dieser Arbeit wurde die histologische Messung der MVD der *in vivo* Messung vorgezogen [177].

Eine höhere bzw. dichtere MVD bedingt eine bessere Versorgung des Tumors und somit auch ein erhöhtes Tumorwachstum [169]. Bereits bei anderen Tumorentitäten konnte der Einfluss chronischen Stresses auf das Tumorwachstum nachgewiesen werden. Thaker et al. untersuchten den Einfluss chronischen Verhaltensstresses an einem murinen orthotopen Ovarialkarzinommodell und konnten zeigen, dass unter chronischem Stress die Gefäßversorgung respektive die Angiogenese deutlich zunahm und nachfolgend zu einem erhöhten Tumorwachstum führte [129]. In einer anderen Arbeit wurde der Einfluss chronischen Stresses auf das Auftreten von Hautkrebs, in dem untersuchten Fall Plattenepithelkarzinome, an haarlosen Mäusen in Kombination mit einer UV-Exposition untersucht. Es zeigte sich, dass chronischer Stress einerseits das Tumorwachstum verstärken und die Rückbildung des Tumors verhindern konnte. Andererseits konnte es durch chronischen Stress zu einer Tumorentstehung *de novo* kommen. In diesen Fällen zeigten die Tumoren invasive Komponenten [178]. Von Wu et al. wurde der Einfluss des sog. sich wiederholenden sozialen Niederlagestresses (engl.: „repeat social defeat stress“ [RSDS]) auf die Progression eines Lungenkarzinoms an Mäusen untersucht. Es zeigte sich, dass RSDS zu einer signifikanten Erhöhung der VEGF-Serumlevel, des Gewichtes und der Größe des Primärtumors sowie der Anzahl der Lymphknoten führte [179].

Dass chronischer Stress über einen längeren Zeitraum eine Steigerung des Wachstums von Pankreaskarzinomen bewirkt, konnte auch in anderen Arbeiten gezeigt werden. Die Hypothese, dass neuropsychologischer Stress begünstigend auf die Progression eines Pankreaskarzinoms einwirkt, wurde von Schuller et al. aufgestellt und in einer Arbeit bewiesen. Hierzu wurde ein Xenograftmodell mit athymen Nacktmäusen als Versuchstiere benutzt. Es erfolgte die ektope subkutane Injektion von humanen Pankreaskarzinomzellen der Zelllinien Panc-1 und BxPc-3 in die rechte Flanke des Versuchstieres. Anschließend wurde das Tier sozialem Stress ausgesetzt. Bei beiden Zellreihen zeigte sich, dass chronischer Stress mit einer erhöhten Ausschüttung von VEGF und einem erhöhten Tumorwachstum bzw. einer erhöhten Tumorgröße einherging [180]. In einer anderen Arbeit von Kim-Fuchs et al. konnte ebenfalls gezeigt werden, dass chronischer Stress das Wachstum von Pankreaskarzinomen beschleunigte. Es wurden humane Pankreaskarzinomzellen

der Zellreihe Panc-1 in einem orthotopen Tumormodell in BALB/c-Foxn1nu athymen Nacktmäusen implantiert. Die Stressapplikation erfolgte als Engestress. Das Ausmaß des Stresses wurde durch die Veränderungen des Körpergewichtes und die Katecholaminlevel im Gewebe gemessen und führte zu einer erhöhten Tumorwachstumsrate von  $11 \pm 3$  % pro Tag verglichen mit der Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ) und einer fünffachen Erhöhung der Tumormasse ( $41 \text{ mg} \pm 12$  vs.  $7,5 \text{ mg} \pm 5$ ,  $p < 0,03$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusätzlichen Einfluss übte der chronische Stress auf die Metastasierungstendenz aus. Sie lag bei 50 % der gestressten Versuchstiere im Vergleich zu 0 % in der Kontrollgruppe [181].

In der eigenen Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass chronischer Stress mit einem stärkeren Wachstum von orthotopen 6606-PDA Tumoren in der Maus assoziiert war. Nach 5 Wochen chronischen Stresses zeigte sich in der Kontrollgruppe eine Tumorgroße von  $348 \pm 76 \text{ mm}^3$  und in der Stressgruppe eine Tumorgroße von  $799 \pm 143 \text{ mm}^3$ . Dieser Unterschied war mit  $p = 0,0061$  signifikant. Auch das mediane Überleben reduzierte sich von 66 Tagen in der Kontrollgruppe auf 52 Tage in der Stressgruppe unter chronischen Stressbedingungen ( $p = 0,0058$ ) [182, 183].

Dieser Zusammenhang zwischen chronischem Stress und vermehrtem Tumorwachstum konnte in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In der 4 Wochengruppe ließ sich eine Zunahme des Tumolvolumens von  $140,3 \pm 25,53 \text{ mm}^3$  in der Kontrollgruppe auf  $207,0 \pm 57,0 \text{ mm}^3$  in der Stressgruppe unter chronischen Stressbedingungen beobachten. Dieser Unterschied war mit  $p < 0,05$  signifikant. Weiterhin zeigte sich in der 6 Wochengruppe eine Zunahme des Tumolvolumens von  $285 \pm 51,60 \text{ mm}^3$  in der Kontrollgruppe auf  $336,6 \pm 60,17 \text{ mm}^3$  in der Stressgruppe unter chronischen Stressbedingungen. Dieser Unterschied war jedoch mit  $p = 0,31$  nicht signifikant.

Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür könnte sein, dass der gesamte Versuchsaufbau sehr schwierig ist und die Versuchsreihe von vielen Variablen abhängig ist und der Versuchsaufbau somit eine hohe Varianz bei kleiner Fallzahl („n“) aufwies: So konnten in die Betrachtungen nur sehr wenige Versuchstiere mit einbezogen werden. Die Versuchsbedingungen waren vermutlich trotz standardisierten Ablaufs immer kleinen Schwankungen unterworfen. Alle Abläufe waren klimatischen, jahreszeitlichen oder auch anderen nicht beeinflussbaren Schwankungen unterworfen, sodass die Versuchstiere vor und nach den

Untersuchungsreihen möglicherweise „Stressfaktoren“ ausgesetzt waren. Jedes Versuchstier war ein Individuum und jedes davon reagierte unterschiedlich auf bestimmte Abläufe (wie z.B. die Tumorimplantation, den Transport oder auch nur die Haltung im Käfig mit möglichen sozialen Interaktionen und Rangkämpfen) mit einer möglichen Ausschüttung z. B. von Stresshormonen. Ein gewisses Maß an selbst-induziertem Stress durch die Rahmenbedingungen mag eine zusätzliche Rolle gespielt haben.

Ein Zusammenhang, der in dieser Arbeit jedoch gezeigt werden konnte, ist die Abhängigkeit des Tumorwachstums und der MVD voneinander. So konnte bei der Messung in der 6 Wochengruppe zwar ein Anstieg der MVD in der Stressgruppe verzeichnet werden, dieser war jedoch wie bei der Messung der Tumorumfänge der 6 Wochengruppe nicht signifikant. Da aber sowohl in der Kontroll- als auch in der Stressgruppe die Tumoren gewachsen waren und eine bestimmte Größe hatten, musste sich auch die MVD dementsprechend ausbilden, um die Versorgung der Tumoren zu gewährleisten. Die Auswertung der Daten der 6 Wochengruppe zeigte somit eine positive Tendenz, wenn auch keine Signifikanz, bzgl. des vermehrten Tumorwachstums und der erhöhten MVD unter chronischen Stressbedingungen.

Der Einfluss chronischen Stresses auf das Wachstum und die Angiogenese von Pankreaskarzinomen wurde ebenfalls von Shan et al. untersucht. Bei der Arbeit sollte der Einfluss von negativem sozialen und psychologischen Stress auf die Entwicklung und Progression des Pankreaskarzinoms untersucht werden. In einem pankreatischen Xenograftmausmodell wurden athymen Nacktmäusen humane Pankreaskarzinomzellen der Zelllinien MiaPaCa-2 und BxPc-3 subkutan in die rechte Flanke injiziert und anschließend mit einem Stressmodell (entweder Enge- oder Lärmstress) gestresst, mit Norepinephrin behandelt oder als Kontrollgruppe benutzt. Es zeigte sich, dass nach 35 Tagen die Tumorumfänge in der Engestressgruppe ( $1,29 \pm 0,11 \text{ mm}^3$ ), der Lärmstressgruppe ( $2,02 \pm 0,18 \text{ mm}^3$ ) und auch in der mit Norepinephrin behandelten Gruppe ( $2,37 \pm 0,24 \text{ mm}^3$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $0,57 \pm 0,03 \text{ mm}^3$ ) signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöht waren. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass chronischer Stress die Freisetzung von Stresshormonen förderte und chronischer Stress durch die erhöhte Freisetzung von VEGF, MMP 2 und 9 die Tumorangienese sowie eine erhöhte MVD begünstigten [184]. Bei dieser Arbeit von Shan et al. wurden athyme immundefiziente Nacktmäuse mit einem ektopen Pankreaskarzinommodell und einer postmortalen Untersuchung der MVD verwendet.

Im Gegensatz dazu weist die hier vorliegende Arbeit verschiedene Vorteile und Verbesserungen gegenüber den oben genannten Methoden auf. Zunächst sei die deutliche Verringerung von Versuchstieren nach dem ethischen Prinzip der „3R“ (‚replace‘ (vermeiden), ‚reduce‘ (verringern) und ‚refine‘ (verbessern)) genannt, welches im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der IVM angewandt werden konnte. Sodann wurde ein Stressmodell, welches sowohl den räumlichen als auch den akustischen Stress beinhaltete, benutzt. Als weiterer Vorteil konnte, wie bereits in dieser Arbeit erwähnt, die Untersuchung des Verhaltens eines Tumors auf einen bestimmten Reiz immer an **immunkompetenten** Versuchstieren durchgeführt werden, um ein besseres Verständnis der Interaktionen in Bezug auf das Tumormikromilieu zu erhalten. Ein weiterer Vorteil lag in der Beurteilung bzw. Untersuchung des Verhaltens bzw. der Angiogenese des Primärtumors an der ursprünglichen, d. h. **orthotopen Lage des Tumors**. Denn die Mechanismen der Angiogenese an ektopen Modellen, wie z. B. der Rückenhautkammer oder der subkutanen Injektion in die rechte Flanke, sind unterschiedlich. So können die Ergebnisse nicht exakt von ektopen auf orthotope Tumoren übertragen werden [174]. Im Vergleich mit anderen Arbeiten mussten bei der hier vorliegenden Arbeit die Pankreaskarzinomzellen vor der Injektion nicht noch zusätzlich mit z. B. GFP behandelt werden, um eine visuelle Darstellung zu ermöglichen. Die Applikation von sehr wenig Kontrastmittel kurz vor der Untersuchung war bereits ausreichend, um die Gefäße unter dem Intravitalmikroskop betrachten zu können und stellte einen weiteren Vorteil dieser Methode dar. Der Untersuchungsablauf erfolgte unter standardisierten und messbaren Untersuchungsbedingungen der Vitalparameter am lebenden Versuchstier *in vivo*. Die Messung der MVD *in vivo* hat Vorteile gegenüber der immunhistochemischen Anfärbungstechnik postmortal. Bei der Anfärbetechnik werden postmortal einzelne Schnitte des Tumors untersucht. Mit Hilfe der IVM kann das gesamte Tumolvolumen, sowohl die zentralen Anteile als auch die peripheren Anteile, hier mit größerer Verzweigung der Gefäße, untersucht werden. Durch die IVM können somit die anatomischen und physiologischen Charakteristika des Tumors besser dargestellt werden, als es bei den immunfixierten Schnitten der MVD möglich ist. Ein weiterer Vorteil der IVM liegt in der adäquateren und aussagekräftigeren Darstellung nicht nur der frühen Stadien der Angiogenese, sondern auch der Darstellung des Fortschritts der Angiogenese im zeitlichen Verlauf. Eine weitere Möglichkeit und ein Vorteil der IVM besteht darin, dass bei bestimmten

Fragestellungen die Interaktionen von Zellen (z. B. Leukozyten) mit dem Endothel untersucht werden können. Die IVM bietet eine gute Grundlage zur *in vivo* Messung bzw. Betrachtung der Tumorangiogenese. Auf dieser Grundlage können z. B. die Erfolge von Therapien (z. B. mit Beta-Blockern oder mit VEGF-Rezeptor-Inhibitoren) sehr gut visualisiert werden und führen so zu einer genaueren Aussage der *in vivo* Verhältnisse sowohl im Tumor als auch im Versuchstier selbst. Dieses bietet eine hervorragende Grundlage für zukünftige Untersuchungen mit diesem Modell.

Nachdem die Vorteile der Methode dieser Arbeit herausgestellt wurden, soll nun im weiteren Verlauf erläutert werden, wie sich die hier dargestellten Ergebnisse im Kontext mit einem gesteigerten Wachstumsverhalten unter chronischen Stressbedingungen bei Karzinomen im Allgemeinen und bei der in dieser Arbeit verwendeten murinen Pankreaskarzinomzellreihe 6606-PDA im Speziellen erklären lassen könnten.

Einerseits führt chronischer Stress nachweislich über eine Veränderung der Zellen zu einer Supprimierung des Immunsystems [119, 183, 185]. Andererseits wirken Stresshormone und Katecholamine systemisch und bilden auf diese Weise einen Stimulus zur Expression von VEGF aus den Zellen des Tumormikromilieus. Dieses zeigte sich in Arbeiten, in denen sich im Pankreaskarzinom die Expression von Wachstumsfaktoren wie z. B. VEGF unter chronischen Stressbedingungen *in vivo* und *in vitro* erhöhte [169, 184]. Deshalb können Stresshormone und Katecholamine über die Beeinflussung des Tumormikromilieus die Eigenschaften verschiedener Karzinome modulieren und zugunsten der Karzinomzellen anpassen [126, 127, 130]. So reagierten z. B. humane Melanomzellen ebenfalls mit einer gesteigerten Sekretion von VEGF und mit einer gesteigerten Transkription der VEGF-Zielgene nach Stimulation mit Norepinephrin [126]. Weitere Beispiele wären humane Leber-, Mamma- und Prostatakarzinomzelllinien, die ebenfalls unter dem Einfluss von Norepinephrin mit einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Sekretion und der Transkription von VEGF reagierten [128].

Nun zeigte jedoch nicht jede Karzinomzelle die gleiche Reaktion oder den gleichen Mechanismus auf den Stimulus mit Katecholaminen. In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass Karzinomzellen verschiedener Entitäten unterschiedliche Sensitivitäten und Reaktionsmechanismen gegenüber Katecholaminen besitzen können [186]. So reagierten verschiedene Tumorzelllinien auf Stimulation mit äquivalenten Stresshormondosen mit unterschiedlichen zeitlichen und

konzentrationsabhängigen Sekretionsmustern verschiedener Wachstumsfaktoren. Auch die Dauer des Stresses hatte gegensätzliche Auswirkungen auf das Tumorstadium [185, 187].

In der Literatur findet man bezüglich des proliferativen Einflusses von Katecholaminen auf Pankreaskarzinomzellen *in vitro* eine sehr unterschiedliche Datenlage. In der Arbeit von Stock et al. konnte gezeigt werden, dass, entgegen mehrerer Arbeiten [188, 189], Norepinephrin (10 µM) und Phorbol-12-myristat-13-Azetat (PMA: direkter Aktivator der Proteinkinase C) keinen positiven Einfluss auf die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen (Panc-1, MiaPaCa-2) hatten [190]. Weddle et al. zeigten, dass 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) als Beta-Adrenorezeptoragonist die Proliferation von humanen Pankreaskarzinomzelllinien unterschiedlich beeinflussen konnte: Einerseits reagierte die Zelllinie Panc-1 auf Stimulation mit einer signifikanten Steigerung der Proliferation, andererseits konnte jedoch für die Zelllinie BxPc-3 keine signifikante Steigerung der Proliferation nachgewiesen werden [133]. Im Gegensatz zu Weddle et al. konnten Schuller et al. mit ihrer Arbeit nachweisen, dass sowohl BxPc-3 als auch Panc-1 ähnlich auf die Stimulation mit Isoproterenol (ein synthetisches racemisches Norepinephrin-Derivat, das als Sympathomimetikum verwendet wird) reagierten [191]. Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Isoproterenol auf die murine Zelllinie 6606-PDA und die humane Zelllinie Colo-357 einen stimulierenden Effekt bzgl. Tumorzellmigration, -invasion und-proliferation besaß [183]. Somit scheint die Reaktion der Pankreaskarzinomzelle *in vitro* auf Stresshormone von der vorgegebenen spezifischen Zelllinie, dem experimentellen Design und nicht zuletzt von den Kulturbedingungen und dem Rezeptorprofil der eingesetzten stimulierenden Substanzen abzuhängen.

In der Literatur finden sich Arbeiten, die mit *in vivo* Versuchen die Auswirkungen chronischen Stresses auf das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen untersucht haben. Zunächst soll an dieser Stelle noch die Arbeit von Lamkin et al. genannt werden. In dieser Arbeit wurde die proliferative Aktivität von leukämischen Zellen der B-Zell Reihe (B-ALL) untersucht. Es zeigten sich konträre Einflüsse von Stresshormonen. Während *in vitro* kein Nachweis eines Einflusses auf die proliferative Aktivität der humanen Nalm-6 prä-B ALL-Zellen erbracht wurde, konnte nach Stimulation mit Stresshormonen *in vivo* ein Zuwachs des Tumors und dessen Ausbreitung beobachtet werden. Dieser Umstand sollte, laut Autoren, am ehesten

durch andere Zellen des Tumormikro- und -makromilieus, welche ebenfalls durch die Stresshormone beeinflusst werden, bedingt sein [192]. Die Arbeit von Kim-Fuchs et al. bestätigte diesen Zusammenhang. Zunächst wurde *in vitro* die proliferative Aktivität der Zelllinie Panc-1 unter Stimulation mit Isoproterenol gemessen. Es zeigte sich, dass diese unter dem Stimulus nicht erhöht war. In einem weiteren Schritt konnte aber nach orthotoper Injektion dieser Zelllinie in das murine Pankreas ein deutlich stärkeres Tumorwachstum unter chronischen Stressbedingungen nachgewiesen werden [181]. Allerdings wurden bei dieser Arbeit athymische Nacktmäuse als Versuchstiere benutzt. Die Ergebnisse von Kim-Fuchs et al. konnten für die murine Pankreaskarzinomzelllinie 6606-PDA an C57BL/6 Mäusen in dem Pankreaskarzinommodell unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden. Es zeigte sich, dass es *in vivo* unter chronischen Stressbedingungen zu einer signifikanten Zunahme der Tumorgröße kam [183].

Aufgrund der Ergebnisse der genannten Arbeiten und der vorliegenden Arbeit ist anzunehmen, dass der positive Effekt chronischen Stresses auf das Tumorwachstum *in vivo* am ehesten indirekt über erhöhte Katecholaminkonzentrationen und eine gesteigerte Sekretion von Wachstumshormonen vermittelt wird. Sowohl die Katecholamine als auch die Wachstumsfaktoren (a. e. VEGF) begünstigen die Tumorangiogenese (in dieser Arbeit dargestellt durch eine erhöhte MVD) und führen somit nachfolgend zu einem vermehrten Tumorwachstum.

Es gab in der Vergangenheit immer wieder Versuche, durch experimentelle Studien die Hemmung der von VEGF vermittelten Wirkung auf die Tumorangiogenese und des damit verbundenen Tumorwachstums bzw. die Metastasierung von verschiedenen Tumoren zu belegen [169, 193]. Die Tumordurchblutung wurde historisch als mögliche „Achilles-Ferse“ der soliden Tumoren angesehen. Solide Tumoren können ohne ein adäquates Gefäßsystem max. 1mm im Durchmesser groß werden. 90 % aller Karzinome sind solide Tumoren, die auf ein funktionierendes Gefäßsystem angewiesen sind. Die IVM ist exzellent dazu geeignet dieses System *in vivo* zu untersuchen.

In den letzten Jahren rückte eine neuere Krebstherapie in den Fokus der Forschung, nämlich die der sogenannten „vascular targeted therapies“. Dieser Ansatz ist mit der konventionellen Krebstherapie nicht zu vergleichen, könnte aber in Kombination mit dieser eingesetzt werden. Die Grundlage dieser neueren Krebstherapie bildeten die aktuelleren Verständnisse über Wachstum und Metastasierung der Tumoren, die

gerade durch *in vivo* Studien herausgefunden werden konnten. Der Wirkmechanismus der „vascular targeted therapies“ setzt gezielt am Tumorstroma bzw. am Gefäßsystem an. Hierbei werden zwei große Untergruppen unterschieden. Die erste Gruppe beinhaltet die antiangiogenen Vertreter, die die Neubildung von Gefäßen verhindern sollen und besonders in der Frühphase oder bei asymptomatischen Metastasen als chronische Verlaufstherapie benutzt werden. Hierzu zählt z. B. Bevacizumab als Hauptvertreter der VEGF-Inhibition. Die zweite Gruppe bilden die gefäßzerstörenden Vertreter, die die bereits vorbestehenden Gefäße zerstören sollen und bei einem ausgeprägten Tumorwachstum als Akuttherapie eingesetzt werden. Ein Vertreter dieser Gruppe ist Combretastatin (CA4P), das Tubulin bindet und so zur Zerstörung der Gefäße führt [194].

Auch bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms sind die „vascular targeted therapies“ zunächst in den Fokus der Forschung gerückt. Selbst nach kurativer Operation kommt es meistens zu einem Rezidiv des Tumors. Hierauf haben allerdings die konventionellen Chemotherapien, wie z. B. Gemcitabin, keinen großen Einfluss. Deshalb sollte in einer Studie der Effekt von einem neuen oralen VEGF-Rezeptor-Inhibitor auf die Überlebensrate untersucht werden. Den Versuchstieren, in dem Fall Nacktmäusen, wurden humane Pankreaskarzinomzellen der Zellreihe HPAF-2 und AsPC-1 orthotop implantiert, und nach 2 Wochen erfolgte eine histologisch gesichert kurative Entfernung. Anschließend wurden die Mäuse entweder mit ZK261991, dem oralen VEGF-Rezeptor-Inhibitor, oder einem Placebo behandelt. Es zeigte sich, dass unter dem oralen VEGF-Rezeptor-Inhibitor bei der Zellreihe HPAF-2 die Überlebensrate signifikant verbessert, wohingegen bei AsPC-1 nur eine positive Tendenz zu beobachten war. Ein signifikanter Unterschied bei der Disseminierungsrate oder Einfluss auf die Größe des wiederaufgetretenen Tumors konnten nicht beobachtet werden. Laut Studie sollte eine Kombination aus neuerer antiangiogener und konventioneller Chemotherapie erfolgen, um den adjuvanten Therapieerfolg zu verbessern [195]. Zu einem ähnlichen Schluss kam auch eine andere Studie. Hierbei erfolgte in einem Xenograftmodell die subkutane Implantation von humanen Pankreaskarzinomzellen der Zellreihe AsPC-1. Dann wurde der Effekt von Nintedanib, einem dreifach Angiokinaseinhibitor (VEGF, PDGF, FGF [Fibroblast growth factor]), auf das Überleben der Versuchstiere untersucht. Verglichen wurden je eine Gruppe mit PBS, Nintedanib allein, Gemcitabin allein und Nintedanib in Kombination mit Gemcitabin. Das mittlere Überleben lag in der Gruppe mit PBS bei



16 Tagen; mit Gemcitabin bei 25 Tagen; mit Nintedanib bei 31 Tagen; und mit der Kombination bei 38 Tagen. In Verbindung mit den anderen Ergebnissen der Studie zeigte sich ein starker antitumoraler Effekt des Nintedanibs, der sich in klinischen Studien bestätigen soll [196]. Um diesen Nachweis erbringen zu können, ist das in dieser Arbeit etablierte System eines immunkompetenten Versuchstieres mit einem orthotopen syngenem Pankreaskarzinom ausgezeichnet geeignet. Es kann nicht nur der Untersuchung von Stress und dessen Auswirkung auf die MVD dienen, sondern auch zur Untersuchung von verschiedenen Therapieansätzen benutzt werden, um deren Erfolge aufzuzeigen.

In einem Fallbericht und Review, veröffentlicht im November 2017, wurde eine 58 Jahre alte Chinesin mit einem lokal fortgeschrittenen Pankreaskarzinom vorgestellt. Nach erfolgter Radiochemotherapie (mit Gemcitabin) nahm man an, dass der Tumor stabil sei. Im Verlauf kam es jedoch zum weiteren Tumorprogress mit Pleura-, Lungen- und Lymphknotenmetastasen, die trotz verschiedener Chemotherapien nicht stabilisiert werden konnten. Sie wurde danach mit Apatinib, einem hochselektiven Tyrosinkinaseinhibitor des VEGF-Rezeptors 2, behandelt und erreichte ein 7-monatiges verlängertes Überleben, bevor sie dann verstarb [197].

In der aktuellen AWMF S3 Leitlinie für das Pankreaskarzinom aus dem Jahr 2013 sieht man jedoch von der Therapie mit den „vascular targeted therapies“ ab. Hier heißt es: „Weitere Kombinationen von Gemcitabin mit sogenannten „Targeted Therapies“, wie Cetuximab, Bevacizumab oder Axitinib, besitzen keinen Stellenwert in der Therapie des Pankreaskarzinoms und sollen außerhalb von prospektiven, kontrollierten Studien nicht eingesetzt werden. Diese Kombinationen werden nicht empfohlen. Die Kombinationen von Bevacizumab (VEGF), Cetuximab (EGF) oder Axitinib (Tyrosinkinaseinhibitor --> VEGF 1-3) erbrachten in Phase-III-Studien keine signifikante Verlängerung des Überlebens im Vergleich zu einer alleinigen Gemcitabintherapie“ [10]. Die Leitlinie aus dem Jahr 2013 wird zum Zeitpunkt dieser Arbeit überarbeitet.

Eine andere Arbeit versuchte auf der Grundlage der Abnormalität der Tumorgefäße und der Tumordurchblutung eine Erklärung für die Diskrepanz der Wirkung der „vascular targeted therapies“ (mit VEGF-Rezeptor-Inhibitoren) zwischen präklinischen und klinischen Ergebnissen zu finden. Die Autoren nahmen an, dass im Tumor zahlreiche Mechanismen (angeboren und/oder erworben) zur Resistenzentwicklung gegen eine VEGF- (Rezeptor) - Blockade bestehen/entstehen,

sodass die Wirkung der medikamentösen Therapie deshalb hinter den zunächst hohen Erwartungen zurückblieb [198].

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Erklärung, warum sich die vielversprechenden Resultate der präklinischen Arbeiten bzgl. der antiangiogenen Therapie nicht in den Erfolgen der klinischen Studien widerspiegeln, ist der Stress. In den meisten präklinischen Arbeiten findet der Einfluss des Stresses (ob akut oder chronisch) keine Berücksichtigung. In diesen Arbeiten ist der Therapieerfolg der antiangiogenen Therapie zwar signifikant, aber die Ergebnisse und Erfolge können bei Anwendung im klinischen Alltag (an in Stresssituationen stehenden Menschen) nicht adäquat wiederholt werden [180]. Obwohl die Verbindung von Lebenssituationen mit einem hohen Stressniveau mit der Entwicklung eines Karzinoms in der Literatur noch immer kontrovers diskutiert wird, konnten einige klinische und epidemiologische Studien in den letzten Jahren zeigen, dass eine stresshaltige Lebensweise mit einem erhöhten Krebsrisiko und einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit einhergeht. So konnte z. B. eine symptomatische Depression mit einer erhöhten Morbidität und/oder Mortalität für einige chronische Krankheiten und Malignome assoziiert werden [184]. Eine andere Arbeit untersuchte die Folgen von stressbedingten psychosozialen Faktoren auf Malignome. Es wurden mit Hilfe einer Metaanalyse mehrere hundert Studien ausgewertet. Die Ergebnisse der Arbeit deuteten an, dass die stressbedingten psychosozialen Faktoren negative Auswirkungen auf die Inzidenz und das Überleben von Malignompatienten haben könnten. Diese Ergebnisse sollten laut Autoren jedoch mit Vorsicht interpretiert werden [199]. Aus diesem Grund werden nun geeignetere Tumormodelle, die ebenfalls den Faktor „Stress“ mit in ihre Untersuchungen einbeziehen, benötigt, um eine „lebensechtere“ Darstellung im Versuchsmodell abbilden zu können. Auch hier zeigt sich ein Vorteil der vorliegenden Arbeit. Auf der einen Seite ist die Berücksichtigung des Faktors „Stress“ bei der Versuchsmodellplanung wichtig, auf der anderen Seite besteht die Möglichkeit der Untersuchung tumorbiologischer Zusammenhänge an einem möglichst realistischen biologischen Modell.

Nun ergibt sich für den Faktor Stress ein zusätzlicher Ansatzpunkt für eine neue Therapieoption. Ein Schritt in diese Richtung wurde in den letzten Jahren unternommen, als das mögliche Potential von Betaadrenorezeptor-Antagonisten (kurz Beta-Blocker genannt) erkannt wurde und diese Stoffgruppe in den Fokus der Forschung rückte. Die ersten Beobachtungen zum Nutzen von Propanolol, einem

Vertreter aus der Stoffgruppe der Beta-Blocker, machten Leaute-Labreze et al. im Jahr 2008. Durch die Behandlung mit Propranolol konnten schwere kindliche Hämangiome vollständig zurückgebildet werden [200].

Der Vorteil der Beta-Blocker gegenüber den „vascular targeted therapies“ (mit z. B. VEGF als Ansatzpunkt) besteht in ihrem Ansatzpunkt. Der Angriffspunkt der Beta-Blocker ist der Betaadrenorezeptor. Dieser wird durch Noradrenalin/Norepinephrin und Adrenalin stimuliert und führt über eine Signalkaskade verschiedener Faktoren (z. B. EGF, VEGF) zur verstärkten Angiogenese, Proliferation und Migration der Karzinomzellen (siehe *Punkt 1.6.3*) [135]. VEGF ist hierbei nur eine der möglichen Endstrecken der Signalkaskade, wohingegen die Blockierung der Betaadrenorezeptoren bereits zu Beginn der Signalkaskade erfolgt und dadurch die gesamte Signalkaskade verhindert wird. Es können sich somit keine möglichen Alternativrouten, die zur Angiogenese, Proliferation und Migration führen, ergeben.

Bei einer Arbeit von Al-Wadei et al. wurde der Einfluss von Propranolol auf die Entstehung von Pankreaskarzinomen und das Überleben bei Nachkommen von zuvor behandelten Hamstermuttertieren untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Entstehung eines Pankreaskarzinoms, in der Arbeit auf der Grundlage einer Pankreatitis entstehend (durch Ethanol ausgelöst und durch „Nicotine-derived nitrosamine ketone“ (NNK) als Stressfaktor potenziert), mit der Behandlung von Propranolol von 66,6 % (Stressgruppe, n=12) auf 8,3 % (Therapiegruppe mit Propranolol, n=12) gesenkt werden konnte. Auch die Überlebensrate konnte mit der Behandlung von Propranolol signifikant ( $p < 0,0001$ ) gesteigert werden [135]. In der Arbeit von Kim-Fuchs et al. wurde ebenfalls der Effekt von Propranolol bei chronischem Stress auf das Wachstum des Pankreaskarzinoms untersucht. Unter der Therapie mit Propranolol konnte der Effekt des chronischen Stresses auf das Tumorstadium des Primärtumors geblockt werden (Stress:  $41\text{mg} \pm 13$  vs. Propranolol:  $21\text{mg} \pm 5$ ). Es zeigte sich jedoch keine Veränderung in der Metastasierungsrate [181]. Eine Arbeit unserer Arbeitsgruppe, die den Einfluss von Propranolol auf das Tumorstadium und das Überleben unter chronischen Stressbedingungen untersuchte, zeigte ebenfalls eine Reduktion der Rate des Tumorstadiums und eine erhöhte Überlebensrate in der mit Propranolol behandelten Gruppe (59 Tage vs. 52 Tage  $p < 0,0058$ ) [183]. Eine weitere Arbeit untersuchte den regulativen Effekt von Norepinephrin auf humane Pankreaskarzinomzellen der Zelllinien MiaPaCa-2 und BxPc-3 bzgl. des Verhaltens

der Migration und Invasion und den therapeutischen Effekt von Propanolol. Es zeigte sich, dass Norepinephrin konzentrationsabhängig die Expression von MMP 2 und 9 sowie VEGF erhöhte und dass dieser Effekt durch Propanolol inhibiert werden konnte [134].

Trotz dieser exemplarisch genannten Arbeiten wird der Effekt von Beta-Blockern auf die Tumorprogression und das Tumorstadium sowie die Überlebensrate weiterhin kritisch betrachtet und kontrovers diskutiert. Es wird sogar in zwei Arbeiten die Hypothese aufgestellt, dass der in Patienten gezeigte positive Effekt der Beta-Blocker nicht auf die Therapie an sich, sondern auf den Umstand zurückgeht, dass die Patienten simultan mit Aspirin behandelt wurden [201, 202]. Eine Studie an norwegischen Patienten mit Prostatakrebs konnte diese Annahme jedoch widerlegen. Die Patienten nahmen weder Aspirin noch Statine ein und zeigten bei Behandlung mit Beta-Blockern eine reduzierte Mortalität [203]. Trotzdem wird der Stellenwert der Beta-Blocker-Therapie in der Literatur weiterhin skeptisch eingestuft. Ein aktuelles Mini-Review versuchte die Frage, ob Beta-Blocker das neue potentielle Antitumormittel sind, zu beantworten. Die allgemeine Rolle der Betaadrenorezeptoren konnte, wie bereits erwähnt, veranschaulicht werden. Auch der mögliche Einfluss von Beta-Blockern auf die Inhibition von VEGF, MMP 2 und 9, Interleukin 6 und 8 konnte bestätigt werden. Allerdings konnten keine weiteren generellen Aussagen bzgl. des Erfolges von Beta-Blockern als neue Tumorthherapie getätigt werden, da die Ergebnisse vom Studiendesign, den zu untersuchenden Tumorentitäten und den zusätzlich eingenommenen Medikamenten abhängig waren. Für das Pankreaskarzinom konnte jedoch gezeigt werden, dass hier sowohl  $\beta$ 1- als auch  $\beta$ 2-Adrenorezeptoren exprimiert wurden. Die verstärkende/positive Wirkung von Norepinephrin und Adrenalin auf VEGF und MMP 2 und 9 konnte durch Propanolol vollständig (durch die o. g. zelluläre Signalkaskade *[siehe Abbildung 2: Wirkung der Katecholamine und NNK: über  $\beta$ -Adrenorezeptor ( $\beta$ -Ars) stimulierte Signalkaskade zur Beeinflussung des Tumorstadiums]*) aufgehoben werden. Bei Kombination von Beta-Blockern mit Gemcitabin zeigte sich ein potenzierender Effekt auf die antiproliferative und apoptotische Wirkung [204]. Ob und in wieweit sich die Beta-Blocker als tatsächliche Tumorthherapie durchsetzen werden, muss in weiteren geeigneten Tumormodellen untersucht werden. Für die Untersuchung bzw. Beurteilung der Modulation der humanen Karzinomprogression durch eine

Betablockertherapie und deren Auswirkungen auf die Mikrogefäßebene könnte wiederum die IVM eingesetzt werden.

Gerade bei den Tumoren, deren Progression vermutlich besonders durch Stress gefördert wird, sollten aufgrund aller genannten Erkenntnisse neuere Strategien zur Reduktion des Stresses entwickelt werden, um begünstigend auf die Langzeitprognose, nicht nur der Pankreas-, sondern aller Karzinompatienten einzuwirken. Beim Pankreaskarzinom stellt zunächst allein die Diagnose einen nicht unerheblichen Anteil des in dieser Arbeit behandelten „Stress-Phänomens“ dar [205] und könnte somit schon in der Frühphase der Erkrankung das Tumorstadium positiv und die Prognose negativ beeinflussen. Hinzuzufügen ist, dass der nachfolgend auftretende Stress im Verlauf dieser schweren Erkrankung durch stationäre Aufenthalte, viele Untersuchungen und auch komplexe Operationen zunimmt. Die Katecholamine könnten so bereits in der Frühphase einen entscheidenden Einfluss auf die Angiogenese, das Tumorstadium und die Metastasierung des Pankreaskarzinoms ausüben. Dieser Zusammenhang konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit teilweise bestätigt werden.

Chronischer Stress ist ein wichtiger Einflussfaktor für die Entwicklung von Tumoren, sodass weitere Studien den Einfluss chronischen Stresses auf Tumoren und insbesondere das Pankreaskarzinom untersuchen sollten, um einen geeigneten Ansatzpunkt für eine adäquate Therapie zu finden. Auch in Hinblick auf das Tumormikromilieu, die Versorgung und Nutrition, die Zell-Zell-Interaktionen sowie die Ausbreitung und das Wachstum des Pankreaskarzinoms sollten weitere Arbeiten durchgeführt werden, um das Verständnis der mikroskopischen und makroskopischen Eigenheiten des Pankreaskarzinoms zu untersuchen. Hierbei könnte der Intravitalmikroskopie ein großer Anteil an der *in vivo* Visualisierung zukommen.

## 6 Zusammenfassung

**Hintergrund:** Das Pankreaskarzinom ist ein maligner Tumor, der durch ein invasives Wachstum und ein ausgeprägtes Metastasierungsverhalten charakterisiert ist. Hinzu kommen in den meisten Fällen die verzögerte Diagnosestellung durch die späte klinische Manifestation und die daraus resultierende hohe Mortalität. Durch die sich weiterentwickelnde Forschung konnte gezeigt werden, dass das Tumormikromilieu einen entscheidenden Einfluss auf die Wachstumseigenschaften des Pankreaskarzinoms hat. Insbesondere die Angiogenese, die durch die zahlreichen Wachstumsfaktoren, aber auch durch die von den Betaadrenorezeptoren ausgelöste Signalkaskade beeinflusst wird, trat in den Vordergrund der Forschung. Die Mikrogefäßdichte ist ein Maß für die Ausprägung der Angiogenese und wird teils durch VEGF, aber auch durch Betaadrenorezeptoren beeinflusst. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass chronischer Stress die Konzentration von VEGF erhöht und damit einen positiven Einfluss auf die Angiogenese und das Tumorwachstum hat. Auch die Aktivierung der Betaadrenorezeptoren durch die Stresshormone Adrenalin und Noradrenalin führt zu einer vermehrten Angiogenese, Migration und Proliferation der Karzinomzellen.

**Ziele:** Es sollte zunächst eine Methode gefunden und etabliert werden, mit der unter standardisierten Bedingungen die Mikrogefäßdichte, als Maß für die Angiogenese, *in vivo* am murinen orthotopen syngenem Pankreaskarzinom gemessen werden konnte. Nach Etablierung der Methode sollte untersucht werden, inwieweit chronischer Stress das Tumorwachstum (in dieser Arbeit beispielhaft bestehend aus der Mikrogefäßdichte und dem Tumolvolumen) positiv beeinflusst.

**Methoden:** Es erfolgte eine orthotope syngene Implantation von Pankreaskarzinomzellen der murinen Zelllinie 6606-PDA in den Pankreaskopf von immunkompetenten C57BL/6N Mäusen. Ein Stressmodell zur Applikation von chronisch akustischem Stress und Engestress wurde eingesetzt. Zur Messung der Mikrogefäßdichte (MVD - microvessel density) am murinen orthotopen syngenem Pankreaskarzinom konnte ein *in vivo* Modell entwickelt werden. Hierzu wurde die Intravitalmikroskopie am lebenden Versuchstier mit einem nach extrakorporal gelagerten Pankreas mit Karzinom verwendet. Des Weiteren wurde das Tumolvolumen mit einem Kleintier-MRT und der Vermessung der sogenannten Interessenregionen (ROIs („Region of Interest“)), sowie mit Hilfe einer elektronischen Schieblehre bestimmt.

**Ergebnisse:** Unter dem Einfluss von chronischem Stress nahmen in der vierwöchigen Versuchsgruppe sowohl die MVD als auch das Tumervolumen signifikant zu. Es zeigte sich eine Zunahme der MVD von  $152,4 \pm 24,83 \text{ cm}^{-1}$  in der Kontrollgruppe auf  $186,1 \pm 11,27 \text{ cm}^{-1}$  in der Stressgruppe ( $p=0,03$ ). Das Tumervolumen vergrößerte sich von  $140,3 \pm 25,53 \text{ mm}^3$  in der Kontrollgruppe auf  $207,0 \pm 57,0 \text{ mm}^3$  in der Stressgruppe ( $p=0,03$ ).

In der sechswöchigen Versuchsgruppe zeigte sich ein Anstieg der MVD von  $211,8 \pm 38,17 \text{ cm}^{-1}$  in der Kontrollgruppe unter chronischen Stressbedingungen auf  $228,1 \pm 18,04 \text{ cm}^{-1}$  in der Stressgruppe ( $p=0,42$ ). Das Tumervolumen vergrößerte sich von  $285,0 \pm 51,6 \text{ mm}^3$  in der Kontrollgruppe auf  $336,6 \pm 60,17 \text{ mm}^3$  unter chronischen Stressbedingungen in der Stressgruppe ( $p=0,31$ ). Beide Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

**Thesen:** Anhand dieser Daten ist der positive Einfluss chronischen Stresses auf die Angiogenese, in dieser Arbeit gemessen in Form der Mikrogefäßdichte, und somit auch auf das Tumorstadium, gemessen als Tumervolumen, höchstwahrscheinlich anzunehmen.

In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass die Versuchstiere unter Stressbedingungen nicht nur größere Pankreaskarzinome ausbildeten, sondern sich auch die Konzentration von VEGF deutlich erhöhte. Insgesamt sind weitere Untersuchungen notwendig, um das Interaktionspotential von Stresshormonen mit anderen Wachstumsfaktoren, Signalkaskaden und zellulären Komponenten näher zu verstehen. Dieses Verständnis könnte dann in weiteren Forschungsschritten dazu dienen, das Wachstumsverhalten des Pankreaskarzinoms gezielt zu beeinflussen oder gar im bestmöglichen Fall zu stoppen. Diese Therapieansätze könnten dann, bei deutlich geringerem Nebenwirkungspotential, einen Vorteil für das Patientenüberleben haben.

**Ausblick:** Die Intravitalmikroskopie ist eine gute Methode zur *in vivo* Untersuchung von Geweben und Gefäßen. Das Versuchstier kann unter kontrollierten Bedingungen überwacht werden, so dass eine standardisierte Untersuchung möglich ist. Mit speziellen Kontrastmitteln und Filtern ist das Tumormikromilieu am lebenden Versuchstier gut untersuchbar. Auch in Zukunft eröffnet die Intravitalmikroskopie hervorragende Möglichkeiten zur *in vivo* Betrachtung und Beurteilung der Angiogenese sowie der Zell-Zell-Interaktionen, um das Verständnis des Tumormikro- und -makromilieus zu vergrößern.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Kaatsch, P., C. Spix, S. Hentschel, A. Katalinic, S. Luttman, and C. Stegmaier, , *Krebs in Deutschland 2013/2014*, G.d. Bundes, Editor. 2018, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg): Berlin.
2. Neoptolemos, J.P., *Adjuvant treatment of pancreatic cancer*. Eur J Cancer, 2011. 47 Suppl 3: p. S378-80.
3. Wormann, S.M. and H. Algul, *Risk factors and therapeutic targets in pancreatic cancer*. Front Oncol, 2013. 3: p. 282.
4. Glade, M.J., *Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective*. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. Nutrition, 1999. 15(6): p. 523-6.
5. Nothlings, U. , L.R. Wilkens , S.P. Murphy , J.H. Hankin , B.E. Henderson and L.N. Kolonel, *Meat and fat intake as risk factors for pancreatic cancer: the multiethnic cohort study*. J Natl Cancer Inst, 2005. 97(19): p. 1458-65.
6. Soler, M. , L. Chatenoud , C. La Vecchia , S. Franceschi and E. Negri, *Diet, alcohol, coffee and pancreatic cancer: final results from an Italian study*. Eur J Cancer Prev, 1998. 7(6): p. 455-60.
7. Michaud, D.S. , H.G. Skinner , K. Wu , F. Hu , E. Giovannucci , W.C. Willett , G.A. Colditz and C.S. Fuchs, *Dietary patterns and pancreatic cancer risk in men and women*. J Natl Cancer Inst, 2005. 97(7): p. 518-24.
8. Michaud, D.S. , E. Giovannucci , W.C. Willett , G.A. Colditz and C.S. Fuchs, *Dietary meat, dairy products, fat, and cholesterol and pancreatic cancer risk in a prospective study*. Am J Epidemiol, 2003. 157(12): p. 1115-25.
9. Hine, R.J. , S. Srivastava , J.A. Milner and S.A. Ross, *Nutritional links to plausible mechanisms underlying pancreatic cancer: a conference report*. Pancreas, 2003. 27(4): p. 356-66.
10. *S3 Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom*, AWMF, Editor. 2013, Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, DKG e.V., dt. Krebshilfe e.V.: Berlin. p. 43.
11. Bansal, P. and A. Sonnenberg, *Pancreatitis is a risk factor for pancreatic cancer*. Gastroenterology, 1995. 109(1): p. 247-51.
12. Lowenfels, A.B. , P. Maisonneuve , G. Cavallini , R.W. Ammann , P.G. Lankisch , J.R. Andersen , E.P. Dimagno , A. Andren-Sandberg and L. Domellof, *Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer*. International Pancreatitis Study Group. N Engl J Med, 1993. 328(20): p. 1433-7.
13. Malka, D. , P. Hammel , F. Maire , P. Rufat , I. Madeira , F. Pessione , P. Levy and P. Ruzsniwski, *Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis*. Gut, 2002. 51(6): p. 849-52.
14. Talamini, G. , M. Falconi , C. Bassi , N. Sartori , R. Salvia , E. Caldiron , L. Frulloni , V. Di Francesco , B. Vaona , P. Bovo , I. Vantini , P. Pederzoli and G. Cavallini, *Incidence of cancer in the course of chronic pancreatitis*. Am J Gastroenterol, 1999. 94(5): p. 1253-60.
15. Lowenfels, A.B. , P. Maisonneuve , E.P. DiMagno , Y. Elitsur , L.K. Gates, Jr. , J. Perrault and D.C. Whitcomb, *Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer*. International Hereditary Pancreatitis Study Group. J Natl Cancer Inst, 1997. 89(6): p. 442-6.
16. Howes, N. , M.M. Lerch , W. Greenhalf , D.D. Stocken , I. Ellis , P. Simon , K. Truninger , R. Ammann , G. Cavallini , R.M. Charnley , G. Uomo , M. Delhaye , J. Spicak , B. Drumm , J. Jansen , R. Mountford , D.C. Whitcomb and J.P. Neoptolemos, *Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2004. 2(3): p. 252-61.
17. Matsubayashi, H. , K. Takaori , C. Morizane , H. Maguchi , M. Mizuma , H. Takahashi , K. Wada , H. Hosoi , S. Yachida , M. Suzuki , R. Usui , T. Furukawa , J. Furuse , T. Sato , M. Ueno , Y. Kiyozumi , S. Hijioka , N. Mizuno , T. Terashima , M. Mizumoto , Y. Kodama , M. Torishima , T. Kawaguchi , R. Ashida , M. Kitano , K. Hanada , M. Furukawa , K. Kawabe , Y. Majima and T. Shimosegawa, *Familial pancreatic cancer: Concept, management and issues*. World J Gastroenterol, 2017. 23(6): p. 935-948.



18. Bartsch, D.K. , R. Kress , M. Sina-Frey , R. Grutzmann , B. Gerdes , C. Pilarsky , J.W. Heise , K.M. Schulte , M. Colombo-Benkmann , C. Schleicher , H. Witzigmann , O. Pridohl , M.B. Ghadimi , O. Horstmann , W. von Bernstorff , L. Jochimsen , J. Schmidt , S. Eisold , L. Estevez-Schwarz , S.A. Hahn , K. Schulmann , W. Bock , T.M. Gress , N. Zugel , K. Breitschaft , K. Prenzel , H. Messmann , E. Endlicher , M. Schneider , A. Ziegler , W. Schmiegel , H. Schafer , M. Rothmund and H. Rieder, *Prevalence of familial pancreatic cancer in Germany*. Int J Cancer, 2004. 110(6): p. 902-6.
19. Laakkonen, A. , T. Kauppinen and E. Pukkala, *Cancer risk among Finnish food industry workers*. Int J Cancer, 2006. 118(10): p. 2567-71.
20. Alguacil, J. , M. Porta , F.G. Benavides , N. Malats , M. Kogevinas , E. Fernandez , A. Carrato , J. Rifa and L. Guarner, *Occupation and pancreatic cancer in Spain: a case-control study based on job titles*. PANKRAS II Study Group. Int J Epidemiol, 2000. 29(6): p. 1004-13.
21. Fryzek, J.P. , D.H. Garabrant , S.D. Harlow , R.K. Severson , B.W. Gillespie , M. Schenk and D. Schottenfeld, *A case-control study of self-reported exposures to pesticides and pancreas cancer in southeastern Michigan*. Int J Cancer, 1997. 72(1): p. 62-7.
22. Ojajarvi, I.A. , T.J. Partanen , A. Ahlbom , P. Boffetta , T. Hakulinen , N. Jourenkova , T.P. Kauppinen , M. Kogevinas , M. Porta , H.U. Vainio , E. Weiderpass and C.H. Wesseling, *Occupational exposures and pancreatic cancer: a meta-analysis*. Occup Environ Med, 2000. 57(5): p. 316-24.
23. Stram, M. , S. Liu and A.D. Singhi, *Chronic Pancreatitis*. Surg Pathol Clin, 2016. 9(4): p. 643-659.
24. Gullo, L. , P. Tomassetti , M. Migliori , R. Casadei and D. Marrano, *Do early symptoms of pancreatic cancer exist that can allow an earlier diagnosis?* Pancreas, 2001. 22(2): p. 210-3.
25. de Braud, F. , S. Cascinu and G. Gatta, *Cancer of pancreas*. Crit Rev Oncol Hematol, 2004. 50(2): p. 147-55.
26. Gorelik, O. , M. Shteinschnaider , N. Cohen and D. Almozni-Sarafian, *[Visible Courvoisier's sign: a rare presentation of bile duct obstruction]*. Harefuah, 2013. 152(9): p. 516-7, 565.
27. Huxley, R. , A. Ansary-Moghaddam , A. Berrington de Gonzalez , F. Barzi and M. Woodward, *Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies*. Br J Cancer, 2005. 92(11): p. 2076-83.
28. Chari, S.T. , C.L. Leibson , K.G. Rabe , J. Ransom , M. de Andrade and G.M. Petersen, *Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study*. Gastroenterology, 2005. 129(2): p. 504-11.
29. Goonetilleke, K.S. and A.K. Siriwardena, *Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer*. Eur J Surg Oncol, 2007. 33(3): p. 266-70.
30. Herold, G.e.a., *Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung*. 2019: Herold, G. 1000.
31. Ni, X.G. , X.F. Bai , Y.L. Mao , Y.F. Shao , J.X. Wu , Y. Shan , C.F. Wang , J. Wang , Y.T. Tian , Q. Liu , D.K. Xu and P. Zhao, *The clinical value of serum CEA, CA19-9, and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer*. Eur J Surg Oncol, 2005. 31(2): p. 164-9.
32. Montgomery, R.C. , J.P. Hoffman , L.B. Riley , A. Rogatko , J.A. Ridge and B.L. Eisenberg, *Prediction of recurrence and survival by post-resection CA 19-9 values in patients with adenocarcinoma of the pancreas*. Ann Surg Oncol, 1997. 4(7): p. 551-6.
33. Berger, A.C. , M. Garcia, Jr. , J.P. Hoffman , W.F. Regine , R.A. Abrams , H. Safran , A. Konski , A.B. Benson, 3rd , J. MacDonald and C.G. Willett, *Postresection CA 19-9 predicts overall survival in patients with pancreatic cancer treated with adjuvant chemoradiation: a prospective validation by RTOG 9704*. J Clin Oncol, 2008. 26(36): p. 5918-22.
34. Adamek, H.E. , J. Albert , H. Breer , M. Weitz , D. Schilling and J.F. Riemann, *Pancreatic cancer detection with magnetic resonance cholangiopancreatography and endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a prospective controlled study*. Lancet, 2000. 356(9225): p. 190-3.

35. Hanninen, E.L. , J. Ricke , H. Amthauer , R. Rottgen , M. Bohmig , J. Langrehr , M. Pech , T. Denecke , S. Rosewicz and R. Felix, *Magnetic resonance cholangiopancreatography: image quality, ductal morphology, and value of additional T2- and T1-weighted sequences for the assessment of suspected pancreatic cancer*. Acta Radiol, 2005. 46(2): p. 117-25.
36. Freelove, R. and A.D. Walling, *Pancreatic cancer: diagnosis and management*. Am Fam Physician, 2006. 73(3): p. 485-92.
37. Spick, C. , K. Herrmann and J. Czernin, *18F-FDG PET/CT and PET/MRI Perform Equally Well in Cancer: Evidence from Studies on More Than 2,300 Patients*. J Nucl Med, 2017. 57(3): p. 420-30.
38. Pimiento, J.M. , A.H. Davis-Yadley , R.D. Kim , D.T. Chen , E.A. Eikman , C.G. Berman and M.P. Malafa, *Metabolic Activity by 18F-FDG-PET/CT Is Prognostic for Stage I and II Pancreatic Cancer*. Clin Nucl Med, 2017. 41(3): p. 177-81.
39. *Gastrointestinale Tumoren* D.K. e.V., Editor. 2018, Elsevier. p. 359-395.
40. Del Chiaro, M. , Z. Ateeab , M.R. Hansson , E. Rangelova , R. Segersvard , N. Kartalis , C. Ansorge , M.J. Lohr , U. Arnelo and C. Verbeke, *Survival Analysis and Risk for Progression of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasia of the Pancreas (IPMN) Under Surveillance: A Single-Institution Experience*. Ann Surg Oncol, 2017. 24(4): p. 1120-1126.
41. Kelly, D.M. and I.S. Benjamin, *Pancreatic carcinoma*. Ann Oncol, 1995. 6(1): p. 19-28.
42. Fujita, Y. , M. Kitago , Y. Masugi , O. Itano , M. Shinoda , Y. Abe , T. Hibi , H. Yagi , Y. Fujii-Nishimura , M. Sakamoto and Y. Kitagawa, *Two cases of pancreatic ductal adenocarcinoma with intrapancreatic metastasis*. World J Gastroenterol, 2016. 22(41): p. 9222-9228.
43. Satoh, K. , S. Hamada and T. Shimosegawa, *Involvement of epithelial to mesenchymal transition in the development of pancreatic ductal adenocarcinoma*. J Gastroenterol, 2015. 50(2): p. 140-6.
44. Langley, R.R. and I.J. Fidler, *Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis*. Endocr Rev, 2007. 28(3): p. 297-321.
45. Wittekind, C. and C. Union for International Cancer, *TNM : Klassifikation maligner Tumoren*. 8. Auflage ed. 2018, [Weinheim, Germany]: Wiley-VCH.
46. Hellan, M. , C.L. Sun , A. Artinyan , P. Mojica-Manosa , S. Bhatia , J.D. Ellenhorn and J. Kim, *The impact of lymph node number on survival in patients with lymph node-negative pancreatic cancer*. Pancreas, 2008. 37(1): p. 19-24.
47. Bosman, F.T., Carneiro, F., Hruban, R. H., Theise, N. D., *WHO Classification of Tumors of the Digestive System*, ed. I.A.f.R.o. Cancer. Vol. 3. 2010: WHO.
48. Wasif, N. , C.Y. Ko , J. Farrell , Z. Wainberg , O.J. Hines , H. Reber and J.S. Tomlinson, *Impact of tumor grade on prognosis in pancreatic cancer: should we include grade in AJCC staging?* Ann Surg Oncol, 2010. 17(9): p. 2312-20.
49. Gaedcke, J. , B. Gunawan , M. Grade , R. Szoke , T. Liersch , H. Becker and B.M. Ghadimi, *The mesopancreas is the primary site for R1 resection in pancreatic head cancer: relevance for clinical trials*. Langenbecks Arch Surg, 2010. 395(4): p. 451-8.
50. Verbeke, C.S., *Resection margins and R1 rates in pancreatic cancer--are we there yet?* Histopathology, 2008. 52(7): p. 787-96.
51. Campbell, F. , R.A. Smith , P. Whelan , R. Sutton , M. Raraty , J.P. Neoptolemos and P. Ghaneh, *Classification of R1 resections for pancreatic cancer: the prognostic relevance of tumour involvement within 1 mm of a resection margin*. Histopathology, 2009. 55(3): p. 277-83.
52. Esposito, I. , J. Kleeff , F. Bergmann , C. Reiser , E. Herpel , H. Friess , P. Schirmacher and M.W. Buchler, *Most pancreatic cancer resections are R1 resections*. Ann Surg Oncol, 2008. 15(6): p. 1651-60.
53. Wittekind, C. , C. Compton , P. Quirke , I. Nagtegaal , S. Merkel , P. Hermanek and L.H. Sobin, *A uniform residual tumor (R) classification: integration of the R classification and the circumferential margin status*. Cancer, 2009. 115(15): p. 3483-8.
54. Munding, J. , W. Uhl and A. Tannapfel, *[R classification and pancreatic ductal adenocarcinoma--R 0 is R 0]*. Z Gastroenterol, 2011. 49(10): p. 1423-7.
55. Doi, R. , M. Imamura , R. Hosotani , T. Imaizumi , T. Hatori , K. Takasaki , A. Funakoshi , H. Wakasugi , T. Asano , S. Hishinuma , Y. Ogata , M. Sunamura , K. Yamaguchi , M. Tanaka , S. Takao , T. Aikou , K. Hirata , H. Maguchi , K. Aiura , T. Aoki , A. Kakita , M.

- Sasaki , M. Ozaki , S. Matsusue , S. Higashide , H. Noda , S. Ikeda , S. Maetani and S. Yoshida, *Surgery versus radiochemotherapy for resectable locally invasive pancreatic cancer: final results of a randomized multi-institutional trial*. Surg Today, 2008. 38(11): p. 1021-8.
56. Shaib, Y. , J. Davila , C. Naumann and H. El-Serag, *The impact of curative intent surgery on the survival of pancreatic cancer patients: a U.S. Population-based study*. Am J Gastroenterol, 2007. 102(7): p. 1377-82.
  57. Barugola, G. , S. Partelli , S. Marcucci , N. Sartori , P. Capelli , C. Bassi , P. Pederzoli and M. Falconi, *Resectable pancreatic cancer: who really benefits from resection?* Ann Surg Oncol, 2009. 16(12): p. 3316-22.
  58. Michalski, C.W. , J. Kleeff , M.W. Buchler and H. Friess, *[Surgical therapy of pancreatic carcinoma]*. Zentralbl Chir, 2007. 132(6): p. W86-92.
  59. Diener, M.K. , C. Fitzmaurice , G. Schwarzer , C.M. Seiler , G. Antes , H.P. Knaebel and M.W. Buchler, *Pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (pp Whipple) versus pancreaticoduodenectomy (classic Whipple) for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma*. Cochrane Database Syst Rev, 2011(5): p. CD006053.
  60. Karanikolas, P.J. , E. Davies , R. Kunz , M. Briel , H.P. Koka , D.M. Payne , S.E. Smith , H.P. Hsu , P.W. Lin , C. Bloechle , K.J. Paquet and G.H. Guyatt, *The pylorus: take it or leave it? Systematic review and meta-analysis of pylorus-preserving versus standard whipple pancreaticoduodenectomy for pancreatic or periampullary cancer*. Ann Surg Oncol, 2007. 14(6): p. 1825-34.
  61. Loos, M. , H. Friess and J. Kleeff, *Surgery of malignant pancreatic tumors*. Radiologe, 2009. 49(2): p. 137-43.
  62. Zhou, Y. , Z. Zhang , Y. Liu , B. Li and D. Xu, *Pancreatectomy combined with superior mesenteric vein-portal vein resection for pancreatic cancer: a meta-analysis*. World J Surg, 2012. 36(4): p. 884-91.
  63. Fernandez-del Castillo, C. , D.W. Rattner and A.L. Warshaw, *Standards for pancreatic resection in the 1990s*. Arch Surg, 1995. 130(3): p. 295-9; discussion 299-300.
  64. Shoup, M. , K.C. Conlon , D. Klimstra and M.F. Brennan, *Is extended resection for adenocarcinoma of the body or tail of the pancreas justified?* J Gastrointest Surg, 2003. 7(8): p. 946-52; discussion 952.
  65. Kleeff, J. , H. Friess and M.W. Buchler, *Neoadjuvant therapy for pancreatic cancer*. Br J Surg, 2007. 94(3): p. 261-2.
  66. Gillen, S. , T. Schuster , C. Meyer Zum Buschenfelde , H. Friess and J. Kleeff, *Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis of response and resection percentages*. PLoS Med, 2010. 7(4): p. e1000267.
  67. Assifi, M.M. , X. Lu , G. Eibl , H.A. Reber , G. Li and O.J. Hines, *Neoadjuvant therapy in pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis of phase II trials*. Surgery, 2011. 150(3): p. 466-73.
  68. Neoptolemos, J.P. , D.D. Stocken , C. Bassi , P. Ghaneh , D. Cunningham , D. Goldstein , R. Padbury , M.J. Moore , S. Gallinger , C. Mariette , M.N. Wente , J.R. Izbicki , H. Friess , M.M. Lerch , C. Dervenis , A. Olah , G. Butturini , R. Doi , P.A. Lind , D. Smith , J.W. Valle , D.H. Palmer , J.A. Buckels , J. Thompson , C.J. McKay , C.L. Rawcliffe and M.W. Buchler, *Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial*. JAMA, 2010. 304(10): p. 1073-81.
  69. Oettle, H. , P. Neuhaus , A. Hochhaus , J.T. Hartmann , K. Gellert , K. Ridwelski , M. Niedergethmann , C. Zulke , J. Fahlke , M.B. Arning , M. Sinn , A. Hinke and H. Riess, *Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial*. JAMA, 2013. 310(14): p. 1473-81.
  70. Oettle, H. , S. Post , P. Neuhaus , K. Gellert , J. Langrehr , K. Ridwelski , H. Schramm , J. Fahlke , C. Zuelke , C. Burkart , K. Gutberlet , E. Kettner , H. Schmalenberg , K. Weigang-Koehler , W.O. Bechstein , M. Niedergethmann , I. Schmidt-Wolf , L. Roll , B. Doerken and H. Riess, *Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial*. JAMA, 2007. 297(3): p. 267-77.

71. Sultana, A. , C.T. Smith , D. Cunningham , N. Starling , J.P. Neoptolemos and P. Ghaneh, *Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer*. J Clin Oncol, 2007. 25(18): p. 2607-15.
72. Burris, H.A., 3rd , M.J. Moore , J. Andersen , M.R. Green , M.L. Rothenberg , M.R. Modiano , M.C. Cripps , R.K. Portenoy , A.M. Storniolo , P. Tarassoff , R. Nelson , F.A. Dorr , C.D. Stephens and D.D. Von Hoff, *Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial*. J Clin Oncol, 1997. 15(6): p. 2403-13.
73. Ottaiano, A. , M. Capozzi , C. De Divitiis , A. De Stefano , G. Botti , A. Avallone and S. Tafuto, *Gemcitabine mono-therapy versus gemcitabine plus targeted therapy in advanced pancreatic cancer: a meta-analysis of randomized phase III trials*. Acta Oncol, 2017. 56(3): p. 377-383.
74. Siegel, R. , J. Ma , Z. Zou and A. Jemal, *Cancer statistics, 2014*. CA Cancer J Clin, 2014. 64(1): p. 9-29.
75. Werner, J. and M.W. Buchler, *[Management of pancreatic cancer: recent advances]*. Dtsch Med Wochenschr, 2011. 136(36): p. 1807-10.
76. McGuigan, A. , P. Kelly , R.C. Turkington , C. Jones , H.G. Coleman and R.S. McCain, *Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes*. World J Gastroenterol, 2018. 24(43): p. 4846-4861.
77. Hackert, T. , M.W. Buchler and J. Werner, *Surgical options in the management of pancreatic cancer*. Minerva Chir, 2009. 64(5): p. 465-76.
78. Fujita, T. , T. Nakagohri , N. Gotohda , S. Takahashi , M. Konishi , M. Kojima and T. Kinoshita, *Evaluation of the prognostic factors and significance of lymph node status in invasive ductal carcinoma of the body or tail of the pancreas*. Pancreas, 2010. 39(1): p. e48-54.
79. Riediger, H. , T. Keck , U. Wellner , A. zur Hausen , U. Adam , U.T. Hopt and F. Makowiec, *The lymph node ratio is the strongest prognostic factor after resection of pancreatic cancer*. J Gastrointest Surg, 2009. 13(7): p. 1337-44.
80. La Torre, M. , M. Cavallini , G. Ramacciato , G. Cosenza , S. Rossi Del Monte , G. Nigri , M. Ferri , P. Mercantini and V. Ziparo, *Role of the lymph node ratio in pancreatic ductal adenocarcinoma. Impact on patient stratification and prognosis*. J Surg Oncol, 2011. 104(6): p. 629-33.
81. Zagonel, V. , R. Torta , V. Franciosi , A. Brunello , G. Biasco , D. Cattaneo , L. Cavanna , D. Corsi , G. Farina , L. Fioretto , T. Gamucci , G. Lanzetta , R. Magarotto , M. Maltoni , C. Mastromauro , B. Melotti , F. Meriggi , I. Pavese , E. Piva , C. Sacco , G. Tonini , L. Trentin , P. Ermacora , A. Varetto , F. Merlin , S. Gori , S. Cascinu and C. Pinto, *Early Integration of Palliative Care in Oncology Practice: Results of the Italian Association of Medical Oncology (AIOM) Survey*. J Cancer, 2016. 7(14): p. 1968-1978.
82. Moore, M.J. , D. Goldstein , J. Hamm , A. Figer , J.R. Hecht , S. Gallinger , H.J. Au , P. Murawa , D. Walde , R.A. Wolff , D. Campos , R. Lim , K. Ding , G. Clark , T. Voskoglou-Nomikos , M. Ptasynski and W. Parulekar, *Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*. J Clin Oncol, 2007. 25(15): p. 1960-6.
83. Hruban, R.H. , M. Goggins , J. Parsons and S.E. Kern, *Progression model for pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2000. 6(8): p. 2969-72.
84. Maitra, A. , N. Fukushima , K. Takaori and R.H. Hruban, *Precursors to invasive pancreatic cancer*. Adv Anat Pathol, 2005. 12(2): p. 81-91.
85. Hruban, R.H. , N.V. Adsay , J. Albores-Saavedra , C. Compton , E.S. Garrett , S.N. Goodman , S.E. Kern , D.S. Klimstra , G. Kloppel , D.S. Longnecker , J. Luttges and G.J. Offerhaus, *Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions*. Am J Surg Pathol, 2001. 25(5): p. 579-86.
86. Biankin, A.V. , J.G. Kench , F.P. Dijkman , S.A. Biankin and S.M. Henshall, *Molecular pathogenesis of precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Pathology, 2003. 35(1): p. 14-24.
87. Bachem, M.G. , M. Schunemann , M. Ramadani , M. Siech , H. Beger , A. Buck , S. Zhou , A. Schmid-Kotsas and G. Adler, *Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by*

- stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells*. Gastroenterology, 2005. 128(4): p. 907-21.
88. Farrow, B. , Y. Sugiyama , A. Chen , E. Uffort , W. Nealon and B. Mark Evers, *Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development*. Ann Surg, 2004. 239(6): p. 763-9; discussion 769-71.
  89. Lee, H.O. , S.R. Mullins , J. Franco-Barraza , M. Valianou , E. Cukierman and J.D. Cheng, *FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells*. BMC Cancer, 2011. 11: p. 245.
  90. Erkan, M. , C. Reiser-Erkan , C.W. Michalski , S. Deucker , D. Sauliunaite , S. Streit , I. Esposito , H. Friess and J. Kleeff, *Cancer-stellate cell interactions perpetuate the hypoxia-fibrosis cycle in pancreatic ductal adenocarcinoma*. Neoplasia, 2009. 11(5): p. 497-508.
  91. Pandol, S. , A. Gukovskaya , M. Eddekaoui , D. Dawson , G. Eibl and A. Lugea, *Epidemiology, risk factors, and the promotion of pancreatic cancer: role of the stellate cell*. J Gastroenterol Hepatol, 2012. 27 Suppl 2: p. 127-34.
  92. Maier, H.J. , T. Wirth and H. Beug, *Epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma*. Cancers (Basel), 2010. 2(4): p. 2058-83.
  93. Joussen, A.M. , B. Kirchhof and C. Gottstein, *[Molecular mechanisms of vasculogenesis and angiogenesis. What regulates vascular growth?]*. Ophthalmologe, 2003. 100(4): p. 284-91.
  94. Fleming, I. and R. Busse, *Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. 284(1): p. R1-12.
  95. Palmer, R.M. , D.D. Rees , D.S. Ashton and S. Moncada, *L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. 153(3): p. 1251-6.
  96. Bussolino, F. , A. Mantovani and G. Persico, *Molecular mechanisms of blood vessel formation*. Trends Biochem Sci, 1997. 22(7): p. 251-6.
  97. Tonini, T. , F. Rossi and P.P. Claudio, *Molecular basis of angiogenesis and cancer*. Oncogene, 2003. 22(42): p. 6549-56.
  98. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nat Med, 1995. 1(1): p. 27-31.
  99. Blood, C.H. and B.R. Zetter, *Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis*. Biochim Biophys Acta, 1990. 1032(1): p. 89-118.
  100. Baeriswyl, V. and G. Christofori, *The angiogenic switch in carcinogenesis*. Semin Cancer Biol, 2009. 19(5): p. 329-37.
  101. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. 86(3): p. 353-64.
  102. Korc, M., *Pathways for aberrant angiogenesis in pancreatic cancer*. Mol Cancer, 2003. 2: p. 8.
  103. Shimoyama, S. , F. Gansauge , S. Gansauge , G. Negri , T. Oohara and H.G. Beger, *Increased angiogenin expression in pancreatic cancer is related to cancer aggressiveness*. Cancer Res, 1996. 56(12): p. 2703-6.
  104. Cernaianu, G. , S. Frank , K. Erbstosser , S. Leonhardt , M. Cross , Z. Mclvor , G. Scholz , T. Dansranjavin , I. Celik , A. Tannapfel , C. Wittekind , R.B. Troebbs , K. Rothe , J. Bennek , J. Hauss and H. Witzigmann, *TNP-470 fails to block the onset of angiogenesis and early tumor establishment in an intravital minimal disease model*. Int J Colorectal Dis, 2006. 21(2): p. 143-54.
  105. Schreiber, A.B. , M.E. Winkler and R. Derynck, *Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor*. Science, 1986. 232(4755): p. 1250-3.
  106. Goldman, C.K. , J. Kim , W.L. Wong , V. King , T. Brock and G.Y. Gillespie, *Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology*. Mol Biol Cell, 1993. 4(1): p. 121-33.
  107. Shi, Q. , X. Le , B. Wang , J.L. Abbruzzese , Q. Xiong , Y. He and K. Xie, *Regulation of vascular endothelial growth factor expression by acidosis in human cancer cells*. Oncogene, 2001. 20(28): p. 3751-6.

108. Gerber, H.P. , V. Dixit and N. Ferrara, *Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 1998. 273(21): p. 13313-6.
109. Yancopoulos, G.D. , S. Davis , N.W. Gale , J.S. Rudge , S.J. Wiegand and J. Holash, *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature, 2000. 407(6801): p. 242-8.
110. Cao, Y., *Opinion: emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis*. Nat Rev Cancer, 2005. 5(9): p. 735-43.
111. Achen, M.G. , B.K. McColl and S.A. Stacker, *Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis*. Cancer Cell, 2005. 7(2): p. 121-7.
112. Georgiadou, D. , T.N. Sargentanis , S. Sakellariou , G.M. Filippakis , F. Zagouri , D. Vlachodimitropoulos , T. Psaltopoulou , A.C. Lazaris , E. Patsouris and G.C. Zografos, *VEGF and Id-1 in pancreatic adenocarcinoma: prognostic significance and impact on angiogenesis*. Eur J Surg Oncol, 2014. 40(10): p. 1331-7.
113. Mesters, R.M. , T. Padro , M. Steins , R. Bieker , S. Retzlaff , T. Kessler , J. Kienast and W.E. Berdel, *[Angiogenesis in patients with hematologic malignancies]*. Onkologie, 2001. 24 Suppl 5: p. 75-80.
114. Barau, A. , A. Ruiz-Sauri , G. Valencia , C. Gomez-Mateo Mdel , L. Sabater , A. Ferrandez and A. Llombart-Bosch, *High microvessel density in pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with high grade*. Virchows Arch, 2013. 462(5): p. 541-6.
115. Takagi, K. , T. Takada and H. Amano, *A high peripheral microvessel density count correlates with a poor prognosis in pancreatic cancer*. J Gastroenterol, 2005. 40(4): p. 402-8.
116. Seo, Y. , H. Baba , T. Fukuda , M. Takashima and K. Sugimachi, *High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma*. Cancer, 2000. 88(10): p. 2239-45.
117. Reiche, E.M. , H.K. Morimoto and S.M. Nunes, *Stress and depression-induced immune dysfunction: implications for the development and progression of cancer*. Int Rev Psychiatry, 2005. 17(6): p. 515-27.
118. McEwen, B.S. and T. Seeman, *Protective and damaging effects of mediators of stress. Elaborating and testing the concepts of allostasis and allostatic load*. Ann N Y Acad Sci, 1999. 896: p. 30-47.
119. Dhabhar, F.S. , A.H. Miller , B.S. McEwen and R.L. Spencer, *Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms*. J Immunol, 1995. 154(10): p. 5511-27.
120. Kim, M.H. , F. Gorouhi , S. Ramirez , J.L. Granick , B.A. Byrne , A.M. Soulika , S.I. Simon and R.R. Isseroff, *Catecholamine stress alters neutrophil trafficking and impairs wound healing by beta2-adrenergic receptor-mediated upregulation of IL-6*. J Invest Dermatol, 2014. 134(3): p. 809-17.
121. Flierl, M.A. , D. Rittirsch , M. Huber-Lang , J.V. Sarma and P.A. Ward, *Catecholamines- crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening pandora's box?* Mol Med, 2008. 14(3-4): p. 195-204.
122. Glaser, R. and J.K. Kiecolt-Glaser, *Stress-induced immune dysfunction: implications for health*. Nat Rev Immunol, 2005. 5(3): p. 243-51.
123. Lutgendorf, S.K. , K. DeGeest , L. Dahmouch , D. Farley , F. Penedo , D. Bender , M. Goodheart , T.E. Buekers , L. Mendez , G. Krueger , L. Clevenger , D.M. Lubaroff , A.K. Sood and S.W. Cole, *Social isolation is associated with elevated tumor norepinephrine in ovarian carcinoma patients*. Brain Behav Immun, 2011. 25(2): p. 250-5.
124. Lillberg, K. , P.K. Verkasalo , J. Kaprio , L. Teppo , H. Helenius and M. Koskenvuo, *Stressful life events and risk of breast cancer in 10,808 women: a cohort study*. Am J Epidemiol, 2003. 157(5): p. 415-23.
125. Marchetti, B. , P.G. Spinola , G. Pelletier and F. Labrie, *A potential role for catecholamines in the development and progression of carcinogen-induced mammary tumors: hormonal control of beta-adrenergic receptors and correlation with tumor growth*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1991. 38(3): p. 307-20.
126. Yang, E.V. , S.J. Kim , E.L. Donovan , M. Chen , A.C. Gross , J.I. Webster Marketon , S.H. Barsky and R. Glaser, *Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression*

- in human melanoma tumor cell lines: implications for stress-related enhancement of tumor progression.* Brain Behav Immun, 2009. 23(2): p. 267-75.
127. Yang, E.V. , A.K. Sood , M. Chen , Y. Li , T.D. Eubank , C.B. Marsh , S. Jewell , N.A. Flavahan , C. Morrison , P.E. Yeh , S. Lemeshow and R. Glaser, *Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells.* Cancer Res, 2006. 66(21): p. 10357-64.
  128. Park, S.Y. , J.H. Kang , K.J. Jeong , J. Lee , J.W. Han , W.S. Choi , Y.K. Kim , J. Kang , C.G. Park and H.Y. Lee, *Norepinephrine induces VEGF expression and angiogenesis by a hypoxia-inducible factor-1alpha protein-dependent mechanism.* Int J Cancer, 2011. 128(10): p. 2306-16.
  129. Thaker, P.H. , L.Y. Han , A.A. Kamat , J.M. Arevalo , R. Takahashi , C. Lu , N.B. Jennings , G. Armaiz-Pena , J.A. Bankson , M. Ravoori , W.M. Merritt , Y.G. Lin , L.S. Mangala , T.J. Kim , R.L. Coleman , C.N. Landen , Y. Li , E. Felix , A.M. Sanguino , R.A. Newman , M. Lloyd , D.M. Gershenson , V. Kundra , G. Lopez-Berestein , S.K. Lutgendorf , S.W. Cole and A.K. Sood, *Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma.* Nat Med, 2006. 12(8): p. 939-44.
  130. Sood, A.K. , R. Bhatti , A.A. Kamat , C.N. Landen , L. Han , P.H. Thaker , Y. Li , D.M. Gershenson , S. Lutgendorf and S.W. Cole, *Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells.* Clin Cancer Res, 2006. 12(2): p. 369-75.
  131. Ben-Eliyahu, S. , G.G. Page , R. Yirmiya and G. Shakhar, *Evidence that stress and surgical interventions promote tumor development by suppressing natural killer cell activity.* Int J Cancer, 1999. 80(6): p. 880-8.
  132. Eng, J.W. , K.M. Kokolus , C.B. Reed , B.L. Hylander , W.W. Ma and E.A. Repasky, *A nervous tumor microenvironment: the impact of adrenergic stress on cancer cells, immunosuppression, and immunotherapeutic response.* Cancer Immunol Immunother, 2014. 63(11): p. 1115-28.
  133. Weddle, D.L. , P. Tithoff , M. Williams and H.M. Schuller, *Beta-adrenergic growth regulation of human cancer cell lines derived from pancreatic ductal carcinomas.* Carcinogenesis, 2001. 22(3): p. 473-9.
  134. Guo, K. , Q. Ma , L. Wang , H. Hu , J. Li , D. Zhang and M. Zhang, *Norepinephrine-induced invasion by pancreatic cancer cells is inhibited by propranolol.* Oncol Rep, 2009. 22(4): p. 825-30.
  135. Al-Wadei, H.A. , M.H. Al-Wadei and H.M. Schuller, *Prevention of pancreatic cancer by the beta-blocker propranolol.* Anticancer Drugs, 2009. 20(6): p. 477-82.
  136. Askari, M.D. , M.S. Tsao and H.M. Schuller, *The tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone stimulates proliferation of immortalized human pancreatic duct epithelia through beta-adrenergic transactivation of EGF receptors.* J Cancer Res Clin Oncol, 2005. 131(10): p. 639-48.
  137. Zhang, D. , Q.Y. Ma , H.T. Hu and M. Zhang, *beta2-adrenergic antagonists suppress pancreatic cancer cell invasion by inhibiting CREB, NFkappaB and AP-1.* Cancer Biol Ther, 2010. 10(1): p. 19-29.
  138. Zabora, J. , K. BrintzenhofeSzoc , B. Curbow , C. Hooker and S. Piantadosi, *The prevalence of psychological distress by cancer site.* Psychooncology, 2001. 10(1): p. 19-28.
  139. Zweifach, B., Kossmann, CE., *Micromanipulation of small blood vessels in the mouse.* Am J Physiol, 1937. 120: p. 23-35.
  140. Clark, E.a.C.E., *Observations on changes in blood vascular endothelium in the living animal.* Am J Anat, 1935. 57: p. 358-438.
  141. Nicoll PA, W., RL, *Blood circulation in the subcutaneous tissue of the living bat's wing.* Ann NY Acad Sci, 1946. 46: p. 697-711.
  142. Kawamura, S. , L. Schurer , A. Goetz , O. Kempfski , B. Schmucker and A. Baethmann, *An improved closed cranial window technique for investigation of blood-brain barrier function and cerebral vasomotor control in the rat.* Int J Microcirc Clin Exp, 1990. 9(4): p. 369-83.
  143. Bhathal, P.S. and G.S. Christie, *Intravital fluorescence microscopy of the terminal and subterminal portions of the biliary tree of normal guinea pigs and rats.* Lab Invest, 1969. 20(5): p. 472-9.

144. Kuhnle, G.E. , F.H. Leipfinger and A.E. Goetz, *Measurement of microhemodynamics in the ventilated rabbit lung by intravital fluorescence microscopy*. 1993. 74(3): p. 1462-71.
145. Barker, J.H. , F. Hammersen , I. Bondar , T.J. Galla , M.D. Menger , W. Gross and K. Messmer, *Direct monitoring of nutritive blood flow in a failing skin flap: the hairless mouse ear skin-flap model*. *Plast Reconstr Surg*, 1989. 84(2): p. 303-13.
146. Bondar, I. , E. Uhl , J.H. Barker , T.J. Galla , F. Hammersen and K. Messmer, *A new model for studying microcirculatory changes during dermal wound healing*. *Res Exp Med (Berl)*, 1991. 191(6): p. 379-88.
147. Ricker, G., *Pathologie als Naturwissenschaft*. 1924: Springer Verlag, Berlin.
148. Illig, L., *Die terminale Strombahn. Kapillarbett und Mikrozirkulation*. 1961: Springer Verlag, Berlin.
149. Fagrell, B. and M. Intaglietta, *Microcirculation: its significance in clinical and molecular medicine*. *J Intern Med*, 1997. 241(5): p. 349-62.
150. Linkenheld, C. *Basiswissen rund um die Fluoreszenz*. 2002/2016; Available from: <http://www.mikroskopie.de/kurse/fluoreszenz/elektron.html>.
151. Tuveson, D.A. , L. Zhu , A. Gopinathan , N.A. Willis , L. Kachatrian , R. Grochow , C.L. Pin , N.Y. Mitin , E.J. Taparowsky , P.A. Gimotty , R.H. Hruban , T. Jacks and S.F. Konieczny, *Mist1-KrasG12D knock-in mice develop mixed differentiation metastatic exocrine pancreatic carcinoma and hepatocellular carcinoma*. *Cancer Res*, 2006. 66(1): p. 242-7.
152. Pavlovic, D. , H. Frieling , K.S. Lauer , V.H. Bac , J. Richter , M. Wendt , C. Lehmann , T. Usichenko , K. Meissner and M. Gruending, *Thermostatic tissue platform for intravital microscopy: 'the hanging drop' model*. *J Microsc*, 2006. 224(Pt 2): p. 203-10.
153. Lauer, K.S., *Auswirkungen einer peritonealen Instillation von Taurolidin und Polyhexanid auf die intestinale Mikrozirkulation im endotoxischen Rattenmodell - Inaugural Dissertation an der EMAU 2006*: Greifswald.
154. Steinbauer, M. , A.G. Harris , C. Abels and K. Messmer, *Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model*. *Langenbecks Arch Surg*, 2000. 385(4): p. 290-8.
155. Lehmann, C., *Tierexperimentelle Untersuchung zur intestinalen Mikrozirkulation bei Endotoxinämie - Habilitationsschrift zur Erlangung der Lehrbefähigung im Fach Anästhesiologie. Medizinische Fakultät Charité der Humboldt Universität Berlin*. 2000: Berlin.
156. Bikfalvi, A. and R. Bicknell, *Recent advances in angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting*. *Trends Pharmacol Sci*, 2002. 23(12): p. 576-82.
157. Hotz, H.G. , H.A. Reber , B. Hotz , T. Foitzik , H.J. Buhr , G. Cortina and O.J. Hines, *An improved clinical model of orthotopic pancreatic cancer in immunocompetent Lewis rats*. *Pancreas*, 2001. 22(2): p. 113-21.
158. Partecke, L.I. , M. Sendler , A. Kaeding , F.U. Weiss , J. Mayerle , A. Dummer , T.D. Nguyen , N. Albers , S. Speerforck , M.M. Lerch , C.D. Heidecke , W. von Bernstorff and A. Stier, *A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606-PDA cell lines*. *Eur Surg Res*, 2011. 47(2): p. 98-107.
159. Herreros-Villanueva, M. , E. Hijona , A. Cosme and L. Bujanda, *Mouse models of pancreatic cancer*. *World J Gastroenterol*, 2012. 18(12): p. 1286-94.
160. Morton, C.L. and P.J. Houghton, *Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice*. *Nat Protoc*, 2007. 2(2): p. 247-50.
161. Yang, X. , X. Zhang , M.L. Fu , R.R. Weichselbaum , T.F. Gajewski , Y. Guo and Y.X. Fu, *Targeting the tumor microenvironment with interferon-beta bridges innate and adaptive immune responses*. *Cancer Cell*, 2015. 25(1): p. 37-48.
162. Galon, J. , A. Costes , F. Sanchez-Cabo , A. Kirilovsky , B. Mlecnik , C. Lagorce-Pages , M. Tosolini , M. Camus , A. Berger , P. Wind , F. Zinzindohoue , P. Bruneval , P.H. Cugnenc , Z. Trajanoski , W.H. Fridman and F. Pages, *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. *Science*, 2006. 313(5795): p. 1960-4.
163. Pages, F. , J. Galon , M.C. Dieu-Nosjean , E. Tartour , C. Sautes-Fridman and W.H. Fridman, *Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored*. *Oncogene*, 2010. 29(8): p. 1093-102.



164. Kiank, C. , B. Holtfreter , A. Starke , A. Mundt , C. Wilke and C. Schutt, *Stress susceptibility predicts the severity of immune depression and the failure to combat bacterial infections in chronically stressed mice*. Brain Behav Immun, 2006. 20(4): p. 359-68.
165. Kiank, C. , G. Daeschlein and C. Schuett, *Pneumonia as a long-term consequence of chronic psychological stress in BALB/c mice*. Brain Behav Immun, 2008. 22(8): p. 1173-7.
166. Lutgendorf, S.K. , S. Cole , E. Costanzo , S. Bradley , J. Coffin , S. Jabbari , K. Rainwater , J.M. Ritchie , M. Yang and A.K. Sood, *Stress-related mediators stimulate vascular endothelial growth factor secretion by two ovarian cancer cell lines*. Clin Cancer Res, 2003. 9(12): p. 4514-21.
167. Schuller, H.M., *Impact of neuro-psychological factors on smoking-associated lung cancer*. Cancers (Basel), 2014. 6(1): p. 580-94.
168. Shi, Q. , X. Le , J.L. Abbruzzese , Z. Peng , C.N. Qian , H. Tang , Q. Xiong , B. Wang , X.C. Li and K. Xie, *Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma*. Cancer Res, 2001. 61(10): p. 4143-54.
169. Tsuzuki, Y. , C. Mouta Carreira , M. Bockhorn , L. Xu , R.K. Jain and D. Fukumura, *Pancreas microenvironment promotes VEGF expression and tumor growth: novel window models for pancreatic tumor angiogenesis and microcirculation*. Lab Invest, 2001. 81(10): p. 1439-51.
170. Al-Wadei, M.H. , H.A. Al-Wadei and H.M. Schuller, *Pancreatic cancer cells and normal pancreatic duct epithelial cells express an autocrine catecholamine loop that is activated by nicotinic acetylcholine receptors alpha3, alpha5, and alpha7*. Mol Cancer Res, 2012. 10(2): p. 239-49.
171. Takagi, K. , T. Takada , H. Amano , M. Yoshida , H. Miura , N. Toyota , K. Wada and I. Takahashi, *Analysis of microvessels in pancreatic cancer: by light microscopy, confocal laser scan microscopy, and electron microscopy*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2008. 15(4): p. 384-90.
172. Weidner, N. , J.P. Semple , W.R. Welch and J. Folkman, *Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma*. N Engl J Med, 1991. 324(1): p. 1-8.
173. Bouvet, M. , J. Wang , S.R. Nardin , R. Nassirpour , M. Yang , E. Baranov , P. Jiang , A.R. Moossa and R.M. Hoffman, *Real-time optical imaging of primary tumor growth and multiple metastatic events in a pancreatic cancer orthotopic model*. Cancer Res, 2002. 62(5): p. 1534-40.
174. Yang, M. , E. Baranov , X.M. Li , J.W. Wang , P. Jiang , L. Li , A.R. Moossa , S. Penman and R.M. Hoffman, *Whole-body and intravital optical imaging of angiogenesis in orthotopically implanted tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(5): p. 2616-21.
175. Ryschich, E. , J. Schmidt , G.J. Hammerling , E. Klar and R. Ganss, *Transformation of the microvascular system during multistage tumorigenesis*. Int J Cancer, 2002. 97(6): p. 719-25.
176. Jo, M. , T. Nishikawa , T. Nakajima , Y. Okada , K. Yamaguchi , H. Mitsuyoshi , K. Yasui , M. Minami , M. Iwai , K. Kagawa , Y. Itoh and T. Yoshikawa, *Oxidative stress is closely associated with tumor angiogenesis of hepatocellular carcinoma*. J Gastroenterol, 2011. 46(6): p. 809-21.
177. Shahzad, M.M. , J.M. Arevalo , G.N. Armaiz-Pena , C. Lu , R.L. Stone , M. Moreno-Smith , M. Nishimura , J.W. Lee , N.B. Jennings , J. Bottsford-Miller , P. Vivas-Mejia , S.K. Lutgendorf , G. Lopez-Berestein , M. Bar-Eli , S.W. Cole and A.K. Sood, *Stress effects on FosB- and interleukin-8 (IL8)-driven ovarian cancer growth and metastasis*. J Biol Chem, 2010. 285(46): p. 35462-70.
178. Saul, A.N. , T.M. Oberyszyn , C. Daugherty , D. Kusewitt , S. Jones , S. Jewell , W.B. Malarkey , A. Lehman , S. Lemeshow and F.S. Dhabhar, *Chronic stress and susceptibility to skin cancer*. J Natl Cancer Inst, 2005. 97(23): p. 1760-7.
179. Wu, X. , B.J. Liu , S. Ji , J.F. Wu , C.Q. Xu , Y.J. Du , X.F. You , B. Li , J.J. Le , H.L. Xu , X.H. Duan and J.C. Dong, *Social defeat stress promotes tumor growth and angiogenesis by upregulating vascular endothelial growth factor/extracellular signal-regulated kinase/matrix metalloproteinase signaling in a mouse model of lung carcinoma*. Mol Med Rep, 2015. 12(1): p. 1405-12.

180. Schuller, H.M. , H.A. Al-Wadei , M.F. Ullah and H.K. Plummer, 3rd, *Regulation of pancreatic cancer by neuropsychological stress responses: a novel target for intervention*. Carcinogenesis, 2011. 33(1): p. 191-6.
181. Kim-Fuchs, C. , C.P. Le , M.A. Pimentel , D. Shackelford , D. Ferrari , E. Angst , F. Hollande and E.K. Sloan, *Chronic stress accelerates pancreatic cancer growth and invasion: a critical role for beta-adrenergic signaling in the pancreatic microenvironment*. Brain Behav Immun, 2014. 40: p. 40-7.
182. Partecke, L.I., A. Kaeding, S. Speerforck, F. Seubert, S. Roese, F.U. Weiss, M. Sendler, M.M. Lerch, C.D. Heidecke, and W.v. Bernstorff, *Die durch chronischen Stress induzierte massive Verschlechterung der Prognose beim Pankreaskarzinom kann durch b-Blocker signifikant verbessert werden*. Chirurgisches Forum und DGAV Forum 2010, 2010: p. 73-75.
183. Partecke, L.I. , S. Speerforck , A. Kading , F. Seubert , S. Kuhn , E. Lorenz , S. Schwandke , M. Sendler , W. Kessler , D.N. Trung , S. Oswald , F.U. Weiss , J. Mayerle , C. Henkel , P. Menges , K. Beyer , M.M. Lerch , C.D. Heidecke and W. von Bernstorff, *Chronic stress increases experimental pancreatic cancer growth, reduces survival and can be antagonised by beta-adrenergic receptor blockade*. Pancreatology, 2016 16(3): p. 423-33.
184. Shan, T. , J. Ma , Q. Ma , K. Guo , J. Guo , X. Li , W. Li , J. Liu , C. Huang , F. Wang and E. Wu, *beta2-AR-HIF-1alpha: a novel regulatory axis for stress-induced pancreatic tumor growth and angiogenesis*. Curr Mol Med, 2013. 13(6): p. 1023-34.
185. Dhabhar, F.S. and B.S. McEwen, *Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking*. Brain Behav Immun, 1997. 11(4): p. 286-306.
186. Zhang, J. , Y.T. Deng , J. Liu , Y.Q. Wang , T.W. Yi , B.Y. Huang , S.S. He , B. Zheng and Y. Jiang, *Norepinephrine induced epithelial-mesenchymal transition in HT-29 and A549 cells in vitro*. J Cancer Res Clin Oncol, 2015. 142(2): p. 423-35.
187. Dhabhar, F.S. , A.N. Saul , C. Daugherty , T.H. Holmes , D.M. Bouley and T.M. Oberyzy, *Short-term stress enhances cellular immunity and increases early resistance to squamous cell carcinoma*. Brain Behav Immun, 2010. 24(1): p. 127-37.
188. Lin, X. , K. Luo , Z. Lv and J. Huang, *Beta-adrenoceptor action on pancreatic cancer cell proliferation and tumor growth in mice*. Hepatogastroenterology, 2012. 59(114): p. 584-8.
189. Huang, X.Y. , H.C. Wang , Z. Yuan , J. Huang and Q. Zheng, *Norepinephrine stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration and invasion via beta-adrenergic receptor-dependent activation of P38/MAPK pathway*. Hepatogastroenterology, 2012. 59(115): p. 889-93.
190. Stock, A.M. , D.G. Powe , S.A. Hahn , G. Troost , B. Niggemann , K.S. Zanker and F. Entschladen, *Norepinephrine inhibits the migratory activity of pancreatic cancer cells*. Exp Cell Res, 2013. 319(12): p. 1744-58.
191. Schuller, H.M. , H.A. Al-Wadei and M. Majidi, *GABA B receptor is a novel drug target for pancreatic cancer*. Cancer, 2008. 112(4): p. 767-78.
192. Lamkin, D.M. , E.K. Sloan , A.J. Patel , B.S. Chiang , M.A. Pimentel , J.C. Ma , J.M. Arevalo , K. Morizono and S.W. Cole, *Chronic stress enhances progression of acute lymphoblastic leukemia via beta-adrenergic signaling*. Brain Behav Immun, 2012. 26(4): p. 635-41.
193. Martiny-Baron, G. and D. Marme, *VEGF-mediated tumour angiogenesis: a new target for cancer therapy*. Curr Opin Biotechnol, 1995. 6(6): p. 675-80.
194. Siemann, D.W. , M.C. Bibby , G.G. Dark , A.P. Dicker , F.A. Eskens , M.R. Horsman , D. Marme and P.M. Lorusso, *Differentiation and definition of vascular-targeted therapies*. Clin Cancer Res, 2005. 11(2 Pt 1): p. 416-20.
195. Joensson, P. , B. Hotz , H.J. Buhr and H.G. Hotz, *A novel antiangiogenic approach for adjuvant therapy of pancreatic carcinoma*. Langenbecks Arch Surg, 2011. 396(4): p. 535-41.
196. Awasthi, N. , S. Hinz , R.A. Brekken , M.A. Schwarz and R.E. Schwarz, *Nintedanib, a triple angiokinase inhibitor, enhances cytotoxic therapy response in pancreatic cancer*. Cancer Lett, 2015. 358(1): p. 59-66.

197. Li, C.M. , Z.C. Liu , Y.T. Bao , X.D. Sun and L.L. Wang, *Extraordinary response of metastatic pancreatic cancer to apatinib after failed chemotherapy: A case report and literature review*. World J Gastroenterol, 2017. 23(41): p. 7478-7488.
198. Potente, M. , H. Gerhardt and P. Carmeliet, *Basic and therapeutic aspects of angiogenesis*. Cell, 2011. 146(6): p. 873-87.
199. Chida, Y. , M. Hamer , J. Wardle and A. Steptoe, *Do stress-related psychosocial factors contribute to cancer incidence and survival?* Nat Clin Pract Oncol, 2008. 5(8): p. 466-75.
200. Leaute-Labreze, C. , E. Dumas de la Roque , T. Hubiche , F. Boralevi , J.B. Thambo and A. Taieb, *Propranolol for severe hemangiomas of infancy*. N Engl J Med, 2008. 358(24): p. 2649-51.
201. Holmes, M.D. and W.Y. Chen, *Hiding in plain view: the potential for commonly used drugs to reduce breast cancer mortality*. Breast Cancer Res, 2012. 14(6): p. 216.
202. Holmes, M.D. , S.E. Hankinson , D. Feskanich and W.Y. Chen, *Beta blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors' purported benefit on breast cancer survival may be explained by aspirin use*. Breast Cancer Res Treat, 2013. 139(2): p. 507-13.
203. Grytli, H.H. , M.W. Fagerland , S.D. Fossa and K.A. Tasken, *Association between use of beta-blockers and prostate cancer-specific survival: a cohort study of 3561 prostate cancer patients with high-risk or metastatic disease*. Eur Urol, 2013. 65(3): p. 635-41.
204. Akbar, S. and M.S. Alsharidah, *Are beta blockers new potential anticancer agents?* Asian Pac J Cancer Prev, 2014. 15(22): p. 9567-74.
205. Clark, K.L. , M. Loscalzo , P.C. Trask , J. Zabora and E.J. Philip, *Psychological distress in patients with pancreatic cancer--an understudied group*. Psychooncology, 2010. 19(12): p. 1313-20.

## 8 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### Abbildungen

Abb. 1: Stressinduzierte Produktion verschiedener Neurotransmitter und Hormone und deren Auswirkung auf das Tumormikromilieu .....	24
Abb. 2: Wirkung der Katecholamine und NNK: über $\beta$ -Adrenorezeptor ( $\beta$ -Ars) stimulierte Signalkaskade zur Beeinflussung des Tumorwachstums .....	26
Abb. 3: Grundprinzipien eines Epifluoreszenzmikroskops .....	29
Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs .....	37
Abb. 5: Schematisches Ablaufdiagramm zur Vorbereitung/Durchführung der IVM ..	44
Abb. 6: Schematischer Versuchsaufbau bei der IVM .....	49
Abb. 7a) und 7b): Darstellung des Arbeitsplatzes am Intravitalmikroskop nach dem Prinzip des hängenden Tropfens („Hanging Drop“): .....	51
Abb. 8: Funktion zur Berechnung einer Ellipse und daraus resultierende Formel ....	53
Abb. 9: Skizze I: Untersuchungstisch zur IVM .....	57
Abb. 10: Skizze II: Untersuchungstisch zur IVM .....	58
Abb. 11: Foto I: Frontalansicht des Untersuchungstisches (ohne Versuchstier).....	59
Abb. 12: Foto II: Vogelperspektive des Untersuchungstisches (ohne Versuchstier). 60	
Abb. 13: Nahaufnahme des vorbereiteten Versuchstieres auf dem Tisch .....	62
Abb. 14: Vogelperspektive auf den IVM-Tisch mit vorbereitetem Versuchstier .....	63
Abb. 15: Der IVM-Untersuchungstisch unter dem Mikroskop .....	64
Abb. 16: Intravitalmikroskopisches Bild der Tumorwand .....	65
Abb. 17: Mikrogefäßdichte nach 4 Wochen (Gesichtsfelder) .....	66
Abb. 18: Mikrogefäßdichte nach 4 Wochen (MW $\pm$ SD) .....	67
Abb. 19: Mikrogefäßdichte nach 6 Wochen (Gesichtsfelder) .....	68
Abb. 20: Mikrogefäßdichte nach 6 Wochen (MW $\pm$ SD) .....	69
Abb. 21: MRT-Bildgebung des murinen Pankreaskarzinoms I .....	70
Abb. 22: MRT-Bildgebung des murinen Pankreaskarzinoms II .....	71
Abb. 23: MRT-Bildgebung des murinen Pankreaskarzinoms III .....	72
Abb. 24: MRT-Bildgebung des murinen Pankreaskarzinoms IV .....	73
Abb. 25: Tumolvolumen nach 4 Wochen.....	74
Abb. 26: Tumolvolumen nach 6 Wochen.....	75

## **Tabellen**

Tabelle 1: Klassifikation und Stadieneinteilung nach dem TNM-System .....	9
Tabelle 2: UICC-Stadieneinteilung .....	10
Tabelle 3: Histopathologischer Differenzierungsgrad .....	10
Tabelle 4: Die unterschiedlichen Stadien der R-Klassifikation.....	11
Tabelle 5: Beispiele endogener angiogener und antiangiogener Faktoren.....	18
Tabelle 6: Proangiogene Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, die im humanen Pankreaskarzinom überexprimiert werden.....	20

## **9 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Lukas Bruns

Meine, den 30.04.2019

## 10 Danksagung

Diese Arbeit hätte ohne die Hilfe und tatkräftige Unterstützung von vielen Seiten nicht verwirklicht werden können.

Zu allererst gilt ein besonderer Dank meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Lars Ivo Partecke, der mich in die Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir so die ausgiebige Forschung bzw. Arbeit an dem bis dahin noch neuen und unbekannten Thema ermöglichte. Er unterstützte mich ständig mit theoretischem Rat und praktischer Tat, sodass er es mir ermöglichte mein Wissen „rund um die Maus“ ständig erweitern zu können und hatte einen wesentlichen Anteil an der Umsetzung von der Theorie in die Praxis.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. med. Wolfram von Bernstorff. Sein fachliches Wissen, seine freundliche und kompetente Art, seine stete Hilfsbereitschaft und die über die Jahre hinweg kontinuierliche Unterstützung waren mir stetige Begleiter auf dem langen Weg dieser Arbeit. Des Weiteren möchte ich allen wissenschaftlichen Mitarbeitern und ehemaligen Doktoranden der Arbeitsgruppe „Chirurgische Onkologie“ der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Universität Greifswald für die anregenden fachlichen Diskussionen, die vielen Vorträge und die stets kollegial-freundschaftliche Arbeitsatmosphäre in den Laboreinrichtungen danken. Ein weiterer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Wolfram Keßler, der mir die operativen Techniken zeigte und Herrn Dr. med. Stephan Diedrich, der sich viel Zeit für Gespräche nahm und mich in die Welt der Intravitalmikroskopie einführte.

Diese Arbeit konnte nur aufgrund einer sehr guten Kooperation mit dem Bereich Forschung der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universität Greifswald entstehen. Hier geht ein weiterer herzlicher und großer Dank an Frau Annette Wegner und Herrn PD Dr. Dragan Pavlovic. Ihren Mühen und ihrem Einsatz ist es mit zu verdanken, dass die anfängliche Grundidee wachsen und sich entwickeln konnte.

Ein riesiges und liebevolles Dankeschön möchte ich auch an meine Eltern Christine und Ehrenfried Bruns aussprechen, die mir mit ihrer Unterstützung (moralisch und materiell) nicht nur den Beginn sondern auch den erfolgreichen Abschluss meines Studiums und diese Doktorarbeit ermöglichten. Weiterhin danke ich meinen beiden Schwestern Nina Tees und Inken Bruns für das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie meinem Bruder Johannes Bruns für alles „Mathematische“ in dieser Arbeit.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner geliebten Frau Franziska und meinem kleinen Sohn Jonte Caspar bedanken. Er war der Grund, warum ich wieder begann zu schreiben und du, Franzissi, warst mit deiner geduldigen und liebevollen Unterstützung sowie deinem ermutigenden Beistand in jeder Situation der Grund, warum ich es auch schaffte.